

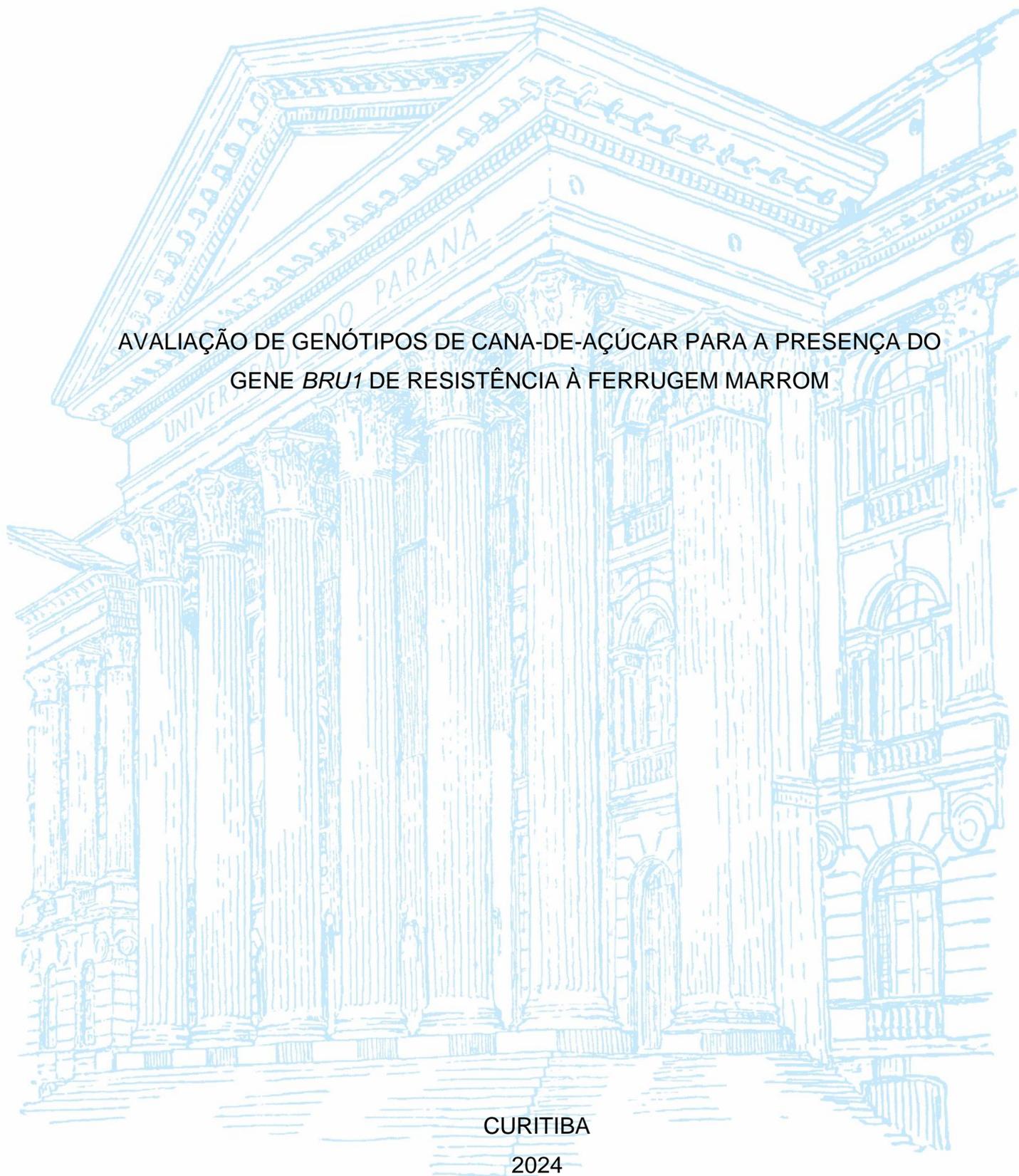
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ELIAS MAKOTO HIOKI

AValiação de genótipos de cana-de-açúcar para a presença do gene *BRU1* de resistência à ferrugem marrom

CURITIBA

2024



ELIAS MAKOTO HIOKI

AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRESENÇA DO
GENE *BRU1* DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM MARROM

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como requisito parcial à obtenção do título de
Engenheiro Agrônomo ao Curso de Graduação de
Agronomia, Setor de Ciências Agrárias,
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof.^a Dra. Alessandra Ribas

CURITIBA

2024

TERMO DE APROVAÇÃO

ELIAS MAKOTO HIOKI

AVALIAÇÃO DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA A PRESENÇA DO GENE *BRU1* DE RESISTÊNCIA À FERRUGEM MARROM

Trabalho apresentado como requisito parcial à obtenção do grau de Engenheiro(a) Agrônomo(a) no Curso de Graduação em Agronomia, pela seguinte banca examinadora:

Documento assinado digitalmente
 **ALESSANDRA FERREIRA RIBAS**
Data: 11/11/2024 13:57:03-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientador Professor(a) Alessandra
Ferreira Ribas Departamento de Fitotecnia e
Fitossanidade

Setor de Ciências Agrárias

Documento assinado digitalmente
 **LUCIMERIS RUARO**
Data: 11/11/2024 16:06:56-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Professor(a) Lucimeris Ruaro
Departamento de Fitotecnia e Fitossanidade

Setor de Ciências Agrárias

Documento assinado digitalmente
 **JOAO CARLOS BESPALHOK FILHO**
Data: 11/11/2024 14:16:31-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Professor João Carlos Bespalhok
Filho Departamento de Fitotecnia e
Fitossanidade Setor de Ciências Agrárias

Curitiba, 07 de novembro de 2024

RESUMO

O Brasil destaca-se como o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, com uma estimativa de produção de 685 milhões de toneladas para a safra de 2024/2025 em uma área aproximada de 8,7 milhões de hectares. A produtividade dessa cultura pode ser influenciada por fatores abióticos e bióticos, sendo as doenças um dos principais limitadores. Dentre elas, destaca-se a ferrugem marrom, causada pelo fungo *Puccinia melanocephala*, a qual provoca lesões foliares e prejudica o desenvolvimento da planta, podendo acarretar perdas superiores a 50% em cultivares suscetíveis. Atualmente, o principal método de controle da ferrugem é o uso de genótipos resistentes, sendo um dos principais critérios de seleção nos programas de melhoramento da cultura. Tal característica é atribuída, em grande parte, ao gene dominante *Bru1*, cuja presença pode ser detectada por meio de dois marcadores moleculares, R12H16 e 9O20-F4-Rsal. O presente estudo teve como objetivo avaliar a presença do gene de resistência em 12 genótipos de cana-de-açúcar pertencentes ao Programa de Melhoramento da RIDESA. Foram realizadas duas extrações de DNA genômico, submetendo-se as amostras a reações de PCR para a amplificação dos marcadores diagnósticos para o gene *Bru1*. Dentre os 12 genótipos avaliados, quatro apresentaram a amplificação dos marcadores R12H16 e 9O20-F4-Rsal, confirmando o caráter resistente à ferrugem marrom. Quanto às demais cultivares, verificou-se apenas a amplificação do marcador 9O20-F4-Rsal, sugerindo um potencial caráter resistente à ferrugem marrom, com exceção de dois genótipos que não apresentaram amplificação para esse marcador.

Palavras-chave: *Puccinia melanocephala*. *Saccharum* spp. Marcador molecular. Degradação de primers. Contaminação de amostras de DNA.

ABSTRACT

Brazil stands out as the world's largest producer of sugarcane, with an estimated production of 685 million tons for the 2024/2025 harvest season, cultivated over an area of approximately 8.7 million hectares. The productivity of this crop can be influenced by abiotic and biotic factors, with diseases being among the main limiting factors. Among these, brown rust, caused by the fungus *Puccinia melanocephala*, is particularly notable, as it causes leaf lesions and hampers plant development, potentially leading to losses exceeding 50% in susceptible cultivars. Currently, the primary method for controlling brown rust is the use of resistant genotypes, which has become one of the key selection criteria in sugarcane breeding programs. This resistance is largely attributed to the dominant gene *Bru1*, whose presence can be identified using two molecular markers, R12H16 and 9O20-F4-Rsal. The present study aimed to evaluate the presence of the resistance gene in 12 sugarcane genotypes from the RIDESA Breeding Program. Two genomic DNA extractions were conducted, and the samples were subjected to PCR reactions to amplify the diagnostic markers for the *Bru1* gene. Among the 12 genotypes evaluated, four exhibited amplification of both markers, R12H16 and 9O20-F4-Rsal, confirming their resistance to brown rust. For the remaining cultivars, only the 9O20-F4-Rsal marker was amplified, suggesting a potential resistance to brown rust, with the exception of two genotypes that did not show amplification for this marker.

Keywords: *Puccinia melanocephala*. *Saccharum* spp. Molecular marker. Primers degradation. Contamination of DNA samples.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - SINTOMAS DE FERRUGEM MARROM (<i>PUCCINIA MELANOCEPHALA</i>) EM FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR.....	18
FIGURA 2 - ACONDICIONAMENTO DE MINIS TOLETES DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RECIPIENTE PLÁSTICO COM SUBSTRATO PARA BROTAÇÃO	20
FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DE MINIS TOLETES DE CANA-DE-AÇÚCAR DENTRO DOS RECIPIENTES PLÁSTICOS	21
FIGURA 4 - MATERIAL VEGETAL DE CANA-DE-AÇÚCAR EM CASA DE VEGETAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE DNA.....	22
FIGURA 5 - AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA GENÔMICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 1	27
FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA GENÔMICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 1	27
FIGURA 7 - REAÇÃO DE PCR PARA AVALIAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DOS OLIGONUCLETÍDEOS INICIADORES R12H16 E 9O20-F4 PARA GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR	28
FIGURA 8 - AUSÊNCIA DE BANDAS CORRESPONDENTES AOS MARCADORES MOLECULARES R12H16 E 9O20-F4 PARA OS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR AVALIADOS	29
FIGURA 9 - AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA GENÔMICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 2	33
FIGURA 10 - AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA GENÔMICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 2	33
FIGURA 11 - REAÇÃO DE PCR COM OS MARCADORES MOLECULARES R12H16 E 9O20-F4 PARA GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 1	34

FIGURA 12 - REAÇÃO DE PCR COM O MARCADOR MOLECULAR 9O20-F4 PARA GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 1	35
FIGURA 13 - REAÇÃO DE PCR PARA AVALIAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO MARCADOR MOLECULAR R12H16 PARA A TRIPLICATA DO CONTROLE POSITIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA O GENE <i>BRU1</i>	35
FIGURA 14 - REAÇÃO DE PCR COM O MARCADOR MOLECULAR 9O20-F4 COM AMOSTRAS DE DNA DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 1	37
FIGURA 15 - REAÇÃO DE PCR COM O MARCADOR MOLECULAR 9O20-F4 COM AMOSTRAS DE DNA DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 2	37
FIGURA 16 - REAÇÃO DE PCR COM O MARCADOR MOLECULAR 9O20-F4 COM AMOSTRAS DE DNA DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 3	38
FIGURA 17 - DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO RSAI DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE PCR DO MARCADOR 9O20-F4 DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 1.....	39
FIGURA 18 - DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO RSAI DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE PCR DO MARCADOR 9O20-F4 DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 2.....	39

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - APLICAÇÕES E QUANTIDADES GERADAS DE SUBPRODUTOS A PARTIR DO PROCESSAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR	14
TABELA 2 - GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR AVALIADOS QUANTO A PRESENÇA DO GENE DE RESISTÊNCIA <i>BRU1</i> E SEUS RESPECTIVOS GENITORES.....	19
TABELA 3 - CÓDIGOS NUMÉRICOS ATRIBUÍDOS AS AMOSTRAS DE DNA DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR AVALIADOS.	23
TABELA 4 - QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 1 POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	26
TABELA 5 - REAVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMOSTRAS DE DNA DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 1	31
TABELA 6 - QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 2 POR ESPECTROFOTOMETRIA.....	32
TABELA 7 - GENOTIPAGEM DAS CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR QUANTO A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS MARCADORES MOLECULARES R12H16 E 9O20-F4-RSAI.....	40

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 CANA-DE-AÇÚCAR	12
2.1.1 Aspectos gerais da cultura	12
2.1.2 Importância econômica da cana-de-açúcar	13
2.1.3 Melhoramento genético da cana-de-açúcar.....	14
2.2 FERRUGEM MARROM	16
2.2.1 História e importância da doença	16
2.2.2 Etiologia e sintomatologia.....	17
2.2.3 Controle da ferrugem marrom.....	18
2.3 RESISTÊNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR À FERRUGEM MARROM	20
2.3.1 Herança da resistência da cana à <i>P. melanocephala</i>	20
2.3.2 Marcadores moleculares associados a resistência à ferrugem marrom	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 CULTIVARES E CLONES DE CANA-DE-AÇÚCAR	19
3.2 BROTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO MATERIAL VEGETAL	20
3.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA	22
3.4 PCR UTILIZANDO OS OLIGONUCLETÍDEOS INICIADORES R12H16 E 9O20-F4 E DIGESTÃO COM A ENZIMA RSAI.....	23
3.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS AMPLICONS	24
3.6 TESTE DOS OLIGONUCLETÍDEOS INICIADORES R12H16 E 9O20-F4.....	24
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1 QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO DNA EXTRAÍDO (EXTRAÇÃO 1)	26
4.2 AMPLIFICAÇÃO TESTE DOS OLIGONUCLETÍDEOS INICIADORES R12H16 E 9O20-F4	28
4.3 INCONSISTÊNCIA NAS REAÇÕES DE PCR.....	28
4.4 QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO DNA EXTRAÍDO (EXTRAÇÃO 2)	31
4.5 REAÇÕES DE PCR COM AMOSTRAS DA EXTRAÇÃO 2.....	34
4.6 AMPLIFICAÇÃO DO MARCADOR 9O20-F4 E DIGESTÃO COM ENZIMA RSAL	36
4.7 FREQUÊNCIA DO MARCADOR 9O20-F4-RSAL NOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR	39

5 CONCLUSÃO	43
6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	44
REFERÊNCIAS.....	45

1 INTRODUÇÃO

Matéria-prima para a produção de açúcar, biocombustível e geração de energia elétrica, a cana-de-açúcar (*Saccharum* spp. L.) apresenta um grande papel no cenário nacional e mundial, não somente pelo valor da produção, mas principalmente pela sua importância no âmbito da sustentabilidade ambiental e socioeconômica, através da geração de empregos e renda. Dentro do ranking global, o Brasil se encontra como o maior produtor de cana-de-açúcar, apresentando uma produção estimada de 685,86 milhões de toneladas para a safra 2024/25 em uma área de quase 8,7 milhões hectares (CONAB, 2024).

Tanto a produtividade como o desenvolvimento da cana-de-açúcar estão diretamente ligados a fatores bióticos e abióticos, como condições edafoclimáticas e problemas fitossanitários. Dentre esses problemas, pode-se destacar as doenças, sendo as ferrugens uma das principais (ZHAO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2021).

A ferrugem marrom, causada pelo fungo *Puccinia melanocephala* H. & P. Syd, apresenta uma grande importância no setor canavieiro. Seu primeiro relato ocorreu na década de 1950, na Índia (PATEL *et al.*, 1950), encontrando-se hoje na maioria das áreas produtoras mundiais de cana (RACEDO *et al.*, 2013; PARCO *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2024). A doença causa lesões nos tecidos foliares da planta, reduzindo sua taxa fotossintética e, conseqüentemente, interferindo no crescimento e na produção da cultura (TOKESHI; RAGO, 2005; HOY; HOLLIER, 2009; ZHAO *et al.*, 2011).

Atualmente, o método mais eficiente para o controle da ferrugem marrom é através do uso de variedades resistentes (RACEDO *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2017), sendo tal característica um dos principais critérios de seleção nos programas de melhoramento (GLYNN *et al.*, 2013).

A resistência à ferrugem marrom é uma característica de alta herdabilidade (SORDI *et al.*, 1988; HOGARTH *et al.*, 1993) sendo controlada principalmente pelo gene dominante *Bru1*, o qual foi identificado primeiramente na cultivar R570 (DAUGROIS *et al.*, 1996; ASNAGHI *et al.*, 2004). Por meio de análises de mapeamento genético, desenvolveram-se dois marcadores moleculares, R12H16 e 9O20-F4-Rsal. Tais marcadores apresentam uma alta eficiência em identificar a presença do gene *Bru1*, permitindo dessa forma, prever o comportamento resistente em genótipos de cana-de-açúcar em programas de melhoramento (COSTET *et al.*,

2012; LI *et al.*, 2017; BARRETO *et al.*, 2017; NEUBER, 2015; BORELLA *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2021).

O objetivo do presente trabalho foi identificar a presença do gene *Bru1* em 12 cultivares de cana-de-açúcar, desenvolvidas pela Universidade Federal do Paraná, consideradas promissoras para o programa de melhoramento da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CANA-DE-AÇÚCAR

2.1.1 Aspectos gerais da cultura

Pertencente à tribo Andropogoneae, família Poaceae, gênero *Saccharum*, a cana-de-açúcar é uma planta semi-perene, alógama, poliploide e C4, apresentando seis espécies principais: *S. officinarum* ($2n = 80$), *S. spontaneum* ($2n = 40-128$), *S. edule* ($2n = 60-80$), *S. robustum* ($2n = 60-205$), *S. barberi* ($2n = 81-124$) e *S. sinense* ($2n = 111-120$) (CENSI, 2017; WANG *et al.*, 2017).

Atualmente, grande parte das variedades modernas (*Saccharum* spp.) desenvolvidas e plantadas no mundo são oriundas da hibridação interespecífica das espécies *S. officinarum* e *S. spontaneum*. Acredita-se que o centro de origem delas seja o continente asiático, sendo os locais mais prováveis a Indonésia e a Nova Guiné, donde se espalharam para a China, Índia, Micronésia e Polinésia (D'HONT *et al.*, 2008; AMARAL *et al.*, 2015; MORAIS *et al.*, 2015). No Brasil, acredita-se que a cana-de-açúcar tenha chegado por meio da expedição de Martim Afonso de Sousa, entre 1530 e 1532 (SILVA *et al.*, 2021).

As plantas de *S. officinarum*, comumente chamadas de canas nobres, apresentam colmos grossos pouco fibrosos com alta capacidade de acumular sacarose, entretanto, possuem sistema radicular pouco desenvolvido e baixa resistência a doenças. Já as plantas de *S. spontaneum* possuem colmos curtos e finos com alta porcentagem de fibra e baixo teor de sacarose, apresentando um sistema radicular bem desenvolvido e maior resistência a doenças e estresses abióticos (CESNIK; MIOCQUE, 2004).

A hibridação entre essas duas espécies é denominada de nobilização, ou seja, corresponde ao cruzamento entre um clone nobre, com alto teor de açúcar, com uma espécie aparentada, geralmente vigorosa e/ou resistente a doenças. Posteriormente, são realizados vários retrocruzamentos do híbrido obtido com o mesmo parental nobre. Desta forma, o objetivo é recuperar de forma gradativa as características do clone nobre, havendo uma pequena contribuição genética do clone aparentado (AUGUSTO, 2013).

2.1.2 Importância econômica da cana-de-açúcar

O Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar do mundo. Em 2022, a produção brasileira foi de 724 milhões de toneladas, seguido pela Índia, China, Tailândia e Paquistão (FAO, 2022). Na safra 2023/2024, a produção nacional foi de 713 milhões de toneladas, com um rendimento médio de 85 mil kg/ha em uma área estimada de 8,3 milhões hectares. As exportações de açúcar nesse período foram de 35,2 milhões de toneladas, alcançando cerca de US\$ 18,3 bilhões (CONAB, 2023).

Para a safra 2024/2025, estima-se uma produção aproximada de 686 milhões de toneladas e uma produtividade de 79 mil kg/ha, havendo uma redução de 3,8% e 7,6% em relação à safra anterior, respectivamente. Entre os principais fatores, estão as altas temperaturas em associação com baixos índices pluviométricos na Região Centro-Sul (CONAB, 2024).

Regionalmente, o Sudeste e o Centro-Oeste são as principais regiões produtoras do país, sendo que a primeira concentra cerca de 65% da produção nacional. Ainda nesse contexto, os principais estados produtores são São Paulo (355 milhões t), Minas Gerais (83 milhões t), Goiás (75 milhões t), Mato Grosso do Sul (52 milhões t) e Paraná (37 milhões t). Juntos, os cinco estados correspondem cerca de 87% da produção nacional (CONAB, 2024).

Segundo SILVA *et al.* (2021), além da produção de açúcar, por meio de seus produtos e subprodutos, a cana é uma importante matéria-prima para diversos setores e atividades, como para a indústria alimentícia, a produção de biocombustíveis, a construção civil e na geração de energia elétrica. Estudos tem mostrado a viabilidade do uso de pedaços de cana para imobilizar culturas de Kefir e, assim, obter leite fermentado estável. Além disso, existe ainda a possibilidade do uso de melaço como substrato, em conjunto com o bagaço, para o crescimento de cogumelos e como fonte de carbono em bioprocessos microbianos. Quanto ao bagaço da cana, subproduto da moagem dos colmos, ele pode ser destinado para a produção de etanol de segunda geração, bem como para geração elétrica e térmica, sendo considerado uma energia renovável e sustentável. Já no âmbito da construção civil, as cinzas oriundas da queima do bagaço para produção de energia, têm sido usadas alternativamente ao cimento na confecção de argamassas e concretos. Além dessas possibilidades, os subprodutos da cana podem ser utilizados em outras áreas (TABELA 1).

TABELA 1 - APLICAÇÕES E QUANTIDADES GERADAS DE SUBPRODUTOS A PARTIR DO PROCESSAMENTO DA CANA-DE-AÇÚCAR

Subprodutos	Aplicações	Quantidade gerada
Bagaço	Combustível para caldeira, produção de celulose e alimentação de gado confinado	280 kg/tonelada de cana processada
Torta de filtro	Fertilizante	20 a 40 kg/tonelada de cana processada
Melaço	Produção de proteína, rações, levedura prensada para panificação, antibióticos	40 a 60 kg/tonelada de cana processada
Vinhaça	Alimentação de animais, produção de proteínas (biomassa), produção de metano e fertilização de solos	12 a 18 L/litro de álcool
Óleo fúsel	Matéria-prima para processamento de refinação - solventes	0,05 a 0,2 L/100 litro de álcool
Álcool bruto	Aplicação na produção de álcoois extrafino e neutro, combustível	1 a 5 L/100 litro de álcool
Levedura seca	Ração animal	2,5 kg/100 litro de álcool

Fonte: Adaptado de SILVA *et al.* (2021).

2.1.3 Melhoramento genético da cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é cultivada mundialmente em quase todas as regiões tropicais e subtropicais, sendo o seu melhoramento genético realizado por diversas instituições públicas e privadas. O sucesso no desenvolvimento de novas cultivares por esses programas está diretamente relacionado à correta identificação e uso dos recursos genéticos disponíveis (AMARAL *et al.*, 2015; MORAIS *et al.*, 2015).

Os trabalhos de melhoramento da cana tiveram seu início na virada do século 19, baseando-se em diversas coletas de genótipos em centros de diversidade por pesquisadores de Java e Barbados para a formação de coleções de germoplasma (BERDING; ROACH, 1987; MATSUOKA *et al.*, 2005).

Atualmente, existe muitos Bancos Ativos de Germoplasma (BAG) tanto nacionais como internacionais. O BAG dos EUA e da Índia são considerados como “Bancos Mundiais” devido à grande variabilidade genética que possuem. O BAG americano, localizada em Canal Point, Flórida, conta com mais de 2 mil acessos do gênero *Saccharum*. Já o BAG indiano possui cerca de 2,2 mil acessos, os quais se encontram divididos em Kannur e Coimbatore. Além desses, outros bancos

significativos estão situados em Cuba, África do Sul e Austrália (AMARAL *et al.*, 2015; MORAIS *et al.*, 2015).

No Brasil, os primeiros relatos de melhoramento correspondem ao final do século XIX, período marcado pelo intercâmbio de materiais a partir dos donos de engenho, os quais realizavam melhoramentos empíricos a título de curiosidade. O cunho mais científico dos cruzamentos teve início a partir do século XX, em Pernambuco, através da instalação de duas estações experimentais, em Escada e Curado (MATSUOKA *et al.*, 2005). Tais centros de pesquisa acabaram servindo de base para o surgimento de outros programas de melhoramento, sendo os ativos atualmente: Instituto Agrônomo de Campinas (IAC), Centro de Tecnologia Canavieira (CTC) e Rede Interuniversitária para Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA) (MORAIS *et al.*, 2015).

Em 1971, o Instituto do Açúcar e do Alcool (IAA), órgão do Ministério da Indústria e do Comércio, criou o Programa Nacional de Melhoramento da Cana-de-açúcar (PLANALSUCAR), cujo objetivo era melhorar os rendimentos da cultura tanto no campo como na indústria através da difusão de conhecimentos, produtos e serviços com os produtores. O programa apresentou resultados significativos, no entanto, em 1988, devido a mudanças no cenário da política econômica nacional, programas de subsídios, como o PROÁLCOOL, acabaram sendo encerrados. O resultado disso, foi a extinção do IAA em 1990, assim como a do PLANALSUCAR. Apesar disso, no mesmo ano, houve a incorporação de todo patrimônio físico e de recursos humanos da PLANALSUCAR por Universidades Federais, surgindo assim a RIDESA. Atualmente, composta por 10 Universidades Federais, a RIDESA conta com 79 bases de pesquisa sendo responsável por 65% dos materiais de cana cultivadas no Brasil (RIDESA, 2024).

Conforme MORAIS *et al.* (2015), além de serem destinadas para a produção de açúcar, etanol e eletricidade, há uma demanda crescente de novas cultivares para a produção de etanol celulósico, bioeletricidade e bioquímicos. O desenvolvimento de novas variedades acaba exigindo dos melhoristas a habilidade de compreender as necessidades da cultura e do mercado para então estabelecer as características que serão consideradas ao longo do programa de melhoramento. Entre essas propriedades, pode-se citar: produtividade, época de maturação, teor de fibra, velocidade de crescimento e perfilhamento, ausência de florescimento, crescimento ereto, despalha fácil, brotação e longevidade, adaptabilidade e estabilidade e

tolerância a estresses abióticos. Reunir todos esses aspectos em um único genótipo acaba sendo um trabalho árduo, levando em média de 10 a 15 anos. Além disso, ao longo do melhoramento, novas tecnologias podem ser inseridas no processo produtivo variando com isso a lista de prioridades conforme o tempo.

Dentro de tais prioridades, uma de grande importância é a resistência a doenças, sendo em algumas culturas, o único meio de controle disponível. Desta forma, para o desenvolvimento de cultivares resistentes em programas de melhoramento, é de suma importância ter variabilidade genética e fontes de resistência disponíveis, como cultivares elites, germoplasmas, espécies silvestres e mutações, assim como entender o funcionamento da herança de resistência (THUROW; CASTRO; PEREIRA, 2018).

2.2 FERRUGEM MARROM

2.2.1 História e importância da doença

A ferrugem marrom é causada pelo fungo basidiomiceto *Puccinia melanocephala* H. & P. Syd, sendo pertencente à Ordem Pucciniales, Família Pucciniaceae (EPPO, 2024). Seu primeiro relato ocorreu na Índia, em 1907, em *Erianthus ravennae* (CUMMINS, 1953; SATHE, 1971), sendo observado pela primeira vez na cana-de-açúcar em 1950 em território indiano (PATEL *et al.*, 1950). Na década de 70, surtos ocorreram no Japão, Taiwan e Austrália, chegando nas Américas em 1978, através da República Dominicana, donde se alastrou rapidamente causando perdas superiores a 50% no México em 1981-1982 (PURDY *et al.*, 1983; CARDOSO; SANGUINO, 1988; COMSTOCK *et al.*, 1992).

Na China, a primeira ocorrência da ferrugem marrom foi na Província de Yunnan em 1982, alastrando-se para outras áreas canavieiras como Fujian, Guangdong, Sichuan, Jiangxi e Hainan, sendo considerada uma das doenças mais disseminadas e destrutivas na cultura da cana no país, com perdas de campo de 10 a 40% (RUAN *et al.*, 1983; WANG *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2017).

No Brasil, a doença foi relatada pela primeira vez em 1986 no Município de Capivari, São Paulo, disseminando-se rapidamente pelo país (SANGUINO; TOLEDO, 1983). Acredita-se que sua chegada tenha ocorrido por meio de correntes de ventos provenientes da África (MACCHERONI; MATSUOKA, 2006). Apesar das perdas de

até 50% em variedades suscetíveis (MATSUOKA *et al.*, 1999), a doença não chegou a causar grande epidemia em território nacional, visto que 90% dos canaviais eram compostos por cultivares resistentes (TOKESHI; RAGO, 2005). Entretanto, a ferrugem não causa apenas perdas quantitativas, mas também problemas para os programas de melhoramento, uma vez que, durante as fases de seleção, clones promissores com boas características agrônômicas, mas suscetíveis à doença, acabam sendo eliminados (COMSTOCK; RAID, 1994; TOKESHI; RAGO, 2005).

2.2.2 Etiologia e sintomatologia

O agente etiológico da ferrugem marrom, *P. melanocephala*, produz dois tipos de esporos, uredósporos e teliósporos. Os primeiros correspondem aos esporos de reprodução assexuada do fungo, sendo caracterizados pela coloração marrom-escuro, formato ovóide a elipsóide, densamente equinulados, com 4 a 5 poros germinativos. Já os teliósporos são os esporos reprodutivos sexuais do agente, podendo se formarem isoladamente ou em pústulas urediniais. Geralmente, são marrom-escuros, clavados, lisos, com célula distal dilatada e basal pedicelada (KIMATI *et al.*, 1997).

Ambos os esporos podem germinar, mas a dispersão e infecção são realizados apenas pelos uredósporos, os quais podem ser dispersos através do vento, gotas de água e por materiais vegetais contaminados (CARDOSO; SANGUINO, 1988). Quanto a germinação dos uredósporos, ela acaba sendo favorecida em temperaturas entre 20 e 25 °C, sendo necessário mais de 8 horas de água livre sobre a superfície da folha para ocorrer a infecção (TOKESHI; RAGO, 2016).

Ocorrido a germinação, o tubo germinativo se diferencia em haustório, estrutura fúngica responsável por penetrar no tecido foliar, via estômatos, e absorver os nutrientes (NEUBER, 2015). Passados de 10 a 14 dias, torna-se possível a visualização de pústulas na face abaxial das folhas, ocorrendo a liberação de esporos no ambiente (SANGUINO; TOLEDO, 1983).

Os sintomas da doença são observados principalmente nas folhas da planta (FIGURA 1). Inicialmente, a ferrugem se manifesta na forma de pequenas pontuações cloróticas, as quais evoluem para manchas alongadas, amarelas e paralelas às nervuras. Com o passar do tempo, tais manchas aumentam de tamanho e adquirem coloração avermelhada devido a formação de urédias. Com o rompimento dessas estruturas, na face inferior da folha, ocorre a formação de pústulas de coloração

amarelada à marrom escuro (CARDOSO; SANGUINO, 1988). Em variedades mais suscetíveis, as pústulas podem se agrupar e formar placas de tecido necrosado, afetando o processo de fotossíntese da planta e, conseqüentemente, reduzindo seu desenvolvimento e produtividade (KIMATI *et al.*, 1997; LIMA, 2021).

FIGURA 1 - SINTOMAS DE FERRUGEM MARROM (*PUCCINIA MELANOCEPHALA*) EM FOLHAS DE CANA-DE-AÇÚCAR.



Fonte: DAROS *et al.* (2019).

2.2.3 Controle da ferrugem marrom

Atualmente, o controle da ferrugem marrom pode ser realizado principalmente de duas maneiras: via controle químico, através da utilização de fungicidas, ou via controle genético, o qual se baseia no uso de cultivares resistentes. O uso de fungicidas deve ser de forma preventiva ou no início dos sintomas da doença, sendo recomendado em situações em que a rápida substituição de cultivares suscetíveis por resistentes acaba não sendo possível (CHAPOLA, 2013; SOUZA, 2018). Outras situações para se fazer uso do controle químico são em casos em que ocorre a quebra de resistência do hospedeiro pelo patógeno ou quando se deseja fazer uso de uma cultivar suscetível devido as ótimas características agrônômicas, como é o caso da utilização da cultivar CTC4 no Brasil (KOCH, 2021).

O controle químico na cultura da cana-de-açúcar é recente, sendo que nos últimos anos o número de liberações de fungicidas tem aumentado, situação considerada interessante, uma vez que garante um maior leque de opções para o

combate da doença no campo (KOCH, 2020). Atualmente, no Brasil, existem 9 ingredientes ativos e 22 produtos comerciais registrados no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) para o controle da ferrugem marrom (AGROFIT, 2024). Dos 22 produtos, no Paraná, apenas sete estão liberados, sendo que desses, três com restrições de uso (Agência de Defesa Agropecuária do Paraná – ADAPAR, 2024).

Frente ao limitado número de produtos químicos disponíveis, o uso de variedades resistentes acaba sendo considerado o principal método de controle das ferrugens da cana-de-açúcar, além de ser um método com menor impacto ambiental e possuir menor custo de adoção (LIMA, 2021). Para um controle genético efetivo, alguns pontos devem ser considerados. No canavial, é importante haver uma boa diversidade de cultivares não sendo recomendado um plantio superior a 15% de uma mesma cultivar (NEUBER, 2015). Além disso, faz-se necessário avaliações periódicas quanto à resistência das cultivares plantadas, visto que há possibilidade da existência de diferentes raças de *P. melanocephala*. Na Flórida, foi constatado a presença de quatro raças patogênicas do fungo, fazendo que duas cultivares, antes classificadas como resistentes, passassem a serem suscetíveis, levantando-se com isso a hipótese de que variantes patogênicas surgem nas áreas produtoras e paralelamente ao desenvolvimento de novas variedades (SHINE *et al.*, 2005).

2.3 RESISTÊNCIA DA CANA-DE-AÇÚCAR À FERRUGEM MARROM

2.3.1 Herança da resistência da cana à *P. melanocephala*

Como mostrado anteriormente, o uso de variedades resistentes é a principal forma, atualmente, para se combater a ferrugem marrom nos canaviais, principalmente por apresentar algumas vantagens frente a outros métodos, como: exige pouca ou nenhuma tecnologia adicional para sua utilização, o investimento é economicamente acessível para os produtores rurais e não apresenta impactos ambientais (CENSI, 2017). Por tais motivos, estudos quanto a herança da resistência à ferrugem marrom vem sendo realizados.

DAUGROIS *et al.* (1996), utilizando progênies de autofecundação da cultivar R570, caracterizada como resistente à doença, observaram uma segregação de 3:1 (resistência: suscetibilidade) indicando a existência de um possível gene dominante

(*Bru1*) responsável por conferir resistência a ferrugem marrom. Além disso, HOGARTH *et al.* (1983) e SORDI *et al.* (1988), concluíram que a resistência da cana à ferrugem corresponde a uma característica de alta herdabilidade e transmitida com eficácia, sendo importante a escolha dos genitores em cruzamentos a fim de se obter progênie resistentes.

ASNAGHI *et al.* (2001) por meio da inoculação da cultivar R570 com diferentes isolados de *P. melanocephala*, provenientes do Brasil, Colômbia, Flórida, Guadalupe e Zimbábue, demonstraram que o gene *Bru1* propicia resistência contra isolados de diversas regiões geográficas. Apesar disso, a durabilidade da resistência a ferrugem não é considerada infinita devido à variabilidade e adaptabilidade de *P. melanocephala*, permitindo que cultivares resistentes se tornem suscetíveis (NEUBER, 2015). Segundo BARBOSA (2016), tal fenômeno pode ser justificado pelo ciclo de “boom-and-bust”, o qual consiste na utilização de uma determinada cultivar resistente em larga escala levando a uma maior pressão de seleção sobre o patógeno. O resultado disso, é o surgimento de uma nova variante patogênica e, conseqüentemente, a quebra de resistência da cultivar.

2.3.2 Marcadores moleculares associados a resistência à ferrugem marrom

Com o advento das tecnologias e técnicas modernas de Genética e Biologia Molecular, tornou-se possível a manipulação do material genético e o surgimento dos marcadores moleculares na década de 80. Entre as suas vantagens, têm-se como principais a obtenção de um número praticamente ilimitado de polimorfismos genéticos, o reconhecimento direto do genótipo sem influência ambiental e a possibilidade da detecção do marcador em qualquer estágio de desenvolvimento da planta (FALEIRO, 2007; GUIMARÃES *et al.*, 2009).

Segundo FALEIRO (2007), o uso de marcadores moleculares proporciona a geração de uma grande quantidade de informações sobre identidade genética, a diversidade, a frequência gênica e os relacionamentos filogenéticos dos recursos de determinado germoplasma, auxiliando em diferentes etapas, como coleta, manutenção, caracterização, manejo e utilização dos materiais genéticos. Em programas de melhoramento, tais conhecimentos acabam auxiliando na escolha dos genitores e no planejamento dos cruzamentos a fim de maximizar a heterose e as

combinações gênicas desejadas, assim como identificar genes responsáveis por características agrônômicas qualitativas e quantitativas de interesse.

COSTET *et al.* (2012), analisando um conjunto de 380 materiais de cana provenientes de 30 programas de melhoramento do mundo, identificaram dois marcadores moleculares, R12H16 e 9O20-F4-Rsal, ligados ao gene *Bru1* e fortemente associados a resistência à ferrugem marrom, uma vez que os marcadores se encontravam ausentes nos materiais suscetíveis.

Estudos genômicos realizados por LE CUNFF *et al.* (2008) e COSTET *et al.* (2012) mostraram que *Bru1* se encontra em uma inserção de tamanho desconhecido específica para haplótipos portadores de *Bru1*, estando ausente em outros haplótipos homólogos. Tal inserção induz uma redução de recombinação que leva à um forte desequilíbrio de ligação (LD) na região *Bru1* e um completo LD entre os marcadores moleculares R12H16, localizado na inserção, e 9O20-F4, o qual se encontra flanqueando a inserção.

As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores do marcador R12H16 são os seguintes: Fw: CTA CGA TGA AAC TAC ACC CTT GTC e Rv: CTT ATG TTA GCG TGA CCT ATG GTC. Tal marcador amplifica um fragmento de 570 pares de base (pb). Já o marcador 9O20-F4, têm como oligonucleotídeos iniciadores: Fw: TAC ATA ATT TTA GTG GCA CTC AGC e Rv: ACC ATA ATT CAA TTC TGC AGG TAC, amplificando um fragmento entre 400 e 500 pb independentemente se o material for resistente ou não. Este amplicon deve passar por um processo de digestão com a enzima de restrição Rsal, a qual reconhece e cliva o sítio de restrição GT[^]AC. O resultado é a liberação de um fragmento de 200 pb, o qual é correspondente ao gene de resistência. Tal fragmento é ausente em genótipos suscetíveis, visto que não há o sítio de corte da enzima e, conseqüentemente, não ocorre a liberação do fragmento (COSTET *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2017). Desta forma, a presença do gene de resistência é validada se tanto o marcador R12H16 como o 9O20-F4-Rsal apresentarem amplificação (RACEDO *et al.*, 2013; CENSI, 2017; LI *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2021)

Na China, ZHANG *et al.* (2021) buscaram avaliar a frequência do gene *Bru1* em 60 novas cultivares elites de cana e 34 principais variedades plantadas nas regiões de Yunnan e Guangxi. Das novas cultivares, 41 foram classificadas como resistentes a moderadamente resistentes, e 19 como suscetíveis, estando o gene *Bru1* presente em 36 variedades resistentes e ausente nas outras 5 resistentes e nas 19 variedades

suscetíveis. Dentre as principais cultivares plantadas, 25 foram consideradas resistentes a moderadamente resistentes, e 9 como suscetíveis, sendo que o gene de resistência foi observado em 18 variedades resistentes e ausente em 7 resistentes e nas 9 variedades suscetíveis. Tais resultados indicam que tanto as novas variedades criadas na China, nos últimos anos, quanto as principais cultivares plantadas, possuem o gene de resistência à ferrugem, apresentando alto potencial de uso nos programas de melhoramento.

No Brasil, estudo semelhante foi feito por BORELLA *et al.* (2021), os quais buscaram avaliar a presença do gene *Bru1* em 64 acessos pertencentes à RIDESA, sendo tais materiais os parentais com as maiores participações nas hibridizações do programa dentro do período de 1970 a 2000. Dos 64 acessos, 38 foram caracterizados como resistentes, 13 como intermediários e 12 suscetíveis, sendo que o gene de resistência esteve presente em 37 (58,7%) parentais. Observou-se também um aumento da frequência do gene ao longo dos anos, sendo que nenhum dos materiais dos anos 70 possuíam o gene, ao passo que 76% dos parentais dos anos 2000 apresentavam. A porcentagem de 58,7% indica que o gene *Bru1* é uma das principais fontes de resistência à ferrugem marrom, corroborando com NEUBER (2017) e BARRETO *et al.* (2017), os quais validaram a eficiência dos marcadores R12H16 e 9O20-F4-Rsal em detectar *Bru1*, sendo altamente eficientes na predição da resistência à ferrugem marrom.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi conduzido no Município de Curitiba, Paraná, em casa de vegetação e nos Laboratórios de Fitotecnia, Ecofisiologia e Biologia Molecular, os quais estão localizados no Setor de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

3.1 CULTIVARES E CLONES DE CANA-DE-AÇÚCAR

Para o presente estudo, foram utilizados 13 genótipos provenientes da Rede Interuniversitária para o Desenvolvimento do Setor Sucroenergético (RIDESA) e um genótipo do Centro de Tecnologia Canavieira (CTC), sendo os genótipos RB867515 e CTC4 o controle positivo e negativo para o gene *Bru1*, respectivamente (TABELA 2). Todos os materiais utilizados foram cedidos pela RIDESA, da Estação Experimental de Paranavaí-PR.

TABELA 2 - GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR AVALIADOS QUANTO A PRESENÇA DO GENE DE RESISTÊNCIA *BRU1* E SEUS RESPECTIVOS GENITORES

Clone/Cultivar	Genitor feminino	Genitor masculino
RB867515 (+)	RB72454	?
CTC4 (-)	SP83-5073	?
RB056351	RB855206	?
RB056380	RB855206	?
RB046215	SP93-1322	RB946903
RB046222	SP80-1842	?
RB066443	RB825548	RB931575
RB076537	SP70-3370	RB915079
RB076553	SP70-1143	RB931515
RB116922	RB966928	RB977619
RB116931	RB855113	?
RB116948	SP83-2847	?
RB116966	RB966928	RB863129
RB116969	RB997548	RB956911

Fonte: O autor (2024).

(+): controle positivo, (-): controle negativo, ?: genitor desconhecido.

Tais genótipos foram selecionados para análise em vista de suas características consideradas promissoras para o programa de melhoramento da RIDESA, sendo avaliado a presença ou ausência do gene *Bru1*.

3.2 BROTAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO MATERIAL VEGETAL

Os genótipos foram recebidos na forma de mini toletes de 25 mm de comprimento e uma gema por tolete, sendo acondicionados em recipientes plásticos (375 x 370 x 390 mm) fechados contendo substrato úmido Carolina Soil® (FIGURA 2).

FIGURA 2 - ACONDICIONAMENTO DE MINIS TOLETES DE CANA-DE-AÇÚCAR EM RECIPIENTE PLÁSTICO COM SUBSTRATO PARA BROTAÇÃO



Fonte: O Autor (2024).

Nos recipientes, colocou-se cerca de 16 exemplares de dois genótipos, totalizando 32 minis toletes por recipiente (FIGURA 3), sendo então mantidos em estufa (Fanem® 320-SE) a 30-32 °C, por aproximadamente 7 dias, para brotação e desenvolvimento radicular do material.

FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DE MINIS TOLESTES DE CANA-DE-AÇÚCAR DENTRO DOS RECIPIENTES PLÁSTICOS



Fonte: O Autor (2024).

Posteriormente, cada mini tolete foi transplantado para um tubete de polietileno (280 cm³) com substrato Carolina Soil®, sendo identificado e mantido em casa de vegetação por cerca de 14 dias sob irrigação manual a cada 2 dias (FIGURA 4). Após esse período, quando as plantas apresentavam cerca de 2 a 3 folhas, coletou-se a folha mais nova para o processo de extração de DNA.

FIGURA 4 - MATERIAL VEGETAL DE CANA-DE-AÇÚCAR EM CASA DE VEGETAÇÃO PARA EXTRAÇÃO DE DNA



Fonte: O Autor (2024).

3.3 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO DNA

Neste trabalho, realizou-se duas extrações de DNA, denominadas Extração 1 e Extração 2. A partir de mudas saudáveis, fez-se a coleta de uma folha/planta de 3 plantas/genótipo, totalizando 42 amostras. Devido ao grande número, decidiu-se realizar cada extração em duas etapas diferentes, sendo analisado 21 amostras em cada etapa.

Uma vez cortadas, as folhas foram imediatamente armazenadas em envelopes de alumínio, os quais foram acondicionados em caixa de isopor contendo gelo. Posteriormente, com o auxílio de nitrogênio líquido, as folhas foram maceradas até o ponto de pó fino para então realizar a extração de DNA.

O DNA foi extraído com base no protocolo de extração de tecidos vegetais CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) de Doyle e Doyle (1987), havendo algumas

modificações para a Extração 2. A fim de obter amostras de DNA com maior pureza, as amostras foram submetidas ao tratamento com clorofórmio duas vezes seguidos.

Feita a extração, as amostras foram identificadas (TABELA 3) e quantificadas por espectrofotometria através do equipamento NanoDrop One/One^C (Thermo Fisher Scientific), sendo usado 1,8 µL de cada amostra. Para estimar a contaminação por proteínas, baseou-se nas absorvâncias 260/280 nm, sendo considerado amostras de boa qualidade aquelas com uma relação entre 1,8 e 2,0. Após a quantificação, as amostras da Extração 2 foram padronizadas para uma concentração de DNA de 10 ng/µL em um volume final de 30 µL.

TABELA 3 - CÓDIGOS NUMÉRICOS ATRIBUÍDOS AS AMOSTRAS DE DNA DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR AVALIADOS.

Clone/Cultivar	Código Amostra DNA
RB116966	1
RB116931	2
RB066443	3
RB046222	4
RB056380	5
RB056351	6
RB867515 (+)	7
RB116948	8
RB046215	9
RB076537	10
RB116922	11
CTC4 (-)	12
RB076553	13
RB116969	14

Fonte: O Autor (2024).

Além disso, para se avaliar a integridade do DNA, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% durante 40 min à 60 volts (V). Para a Extração 1, a partir da avaliação do gel de integridade do DNA, padronizou-se a concentração para 30 ng/ µL em um volume final de 30 µL.

3.4 PCR UTILIZANDO OS OLIGONUCLETÍDEOS INICIADORES R12H16 E 9O20-F4 E DIGESTÃO COM A ENZIMA RSAI

Para a detecção do gene *Bru1*, utilizou-se os marcadores moleculares R12H16 e 9O20-F4, sendo o protocolo para a reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) realizado conforme COSTET *et al.* (2012). Com base nisso, as reações de PCR foram feitas em um volume final de 25 µL, contendo: 12,5 µL de PCR MasterMix (Promega), o qual contém Taq DNA polimerase, MgCl₂ e oligonucleotídeos (dNTP's) em concentrações ótimas para uso, 1 µL de primer senso (10 µM) e 1 µL de primer antisenso (10 µM), 50 ng de DNA genômico e água livre de nuclease para completar o volume.

O programa de amplificação para os dois marcadores foi o mesmo, sendo realizado em termociclador Veriti® 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fisher Scientific) conforme a ciclagem a seguir: 5 min de desnaturação inicial a 94 °C, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 30 s, anelamento de 55 °C por 30 s, extensão de 72 °C por 45 s e extensão final por 5 min a 72 °C (COSTET *et al.*, 2012).

Os produtos de PCR do marcador 9O20-F4 foram submetidos a digestão, usando 15 µL do mesmo, 5 U/µL da enzima Anza 42 RsaI (Invitrogen), Anza 10X Buffer (Invitrogen) e água destilada para completar o volume de 20 µL. Os produtos foram então incubados em termociclador a 37 °C por 30 min.

3.5 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DOS AMPLICONS

Os produtos de PCR usando os dois pares de primers, R12H16 e 9O20-F4, e os produtos da restrição do marcador 9O20-F4-RsaI, foram submetidos separadamente a eletroforese em gel de agarose a 1% e 1,5%, respectivamente, sendo corados com GelRed® e usando como marcador de peso molecular o *ladder* 1 kb ou 100 pb. O tempo de corrida foi de 1h30min a 60 V, sendo utilizado cerca de 8 µL de cada amostra. Posteriormente, observou-se os géis em transluminador UV (Loccus).

Os acessos RB867515 e CTC4 foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente (NEUBER, 2015; CENCI, 2017; BARRETO *et al.*, 2017; BORELLA *et al.*, 2021).

3.6 TESTE DOS OLIGONUCLETÍDEOS INICIADORES R12H16 E 9O20-F4

A fim de verificar a integridade dos primers dos marcadores R12H16 e 9O20-F4, visto que já haviam sido utilizados em um trabalho anterior, uma reação teste de PCR foi realizada, sendo usado para cada marcador 5 amostras (CTC-4, RB867515, RB076553, RB046215 e RB116969), provenientes da Extração 1, e um branco. A reação de PCR foi conduzida conforme descrito anteriormente, sendo a única diferença a utilização do Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO DNA EXTRAÍDO (EXTRAÇÃO 1)

Após a extração, toda amostra de DNA pode ser avaliada quanto à sua concentração e pureza por meio da análise de densidade óptica (DO) em espectrofotômetro. O DNA absorve a luz no comprimento de onda de 260 nm, enquanto proteínas, de 280 nm. A relação entre A260/A280 nm permite determinar a qualidade do DNA extraído, sendo que valores da relação inferiores a 1,8 indicam possível contaminação por proteínas e, conseqüentemente, amostras de menor qualidade (OLIVEIRA *et al.*, 2007). Já valores superiores a 2,0 podem indicar possível contaminação com RNA, fenol e/ou clorofórmio (CARLSSON *et al.*, 2018; NASCIMENTO *et al.*, 2022).

Após a quantificação, o procedimento usualmente feito é a análise de integridade do DNA em gel de agarose. Tal processo permite visualizar a quantidade de quebra de DNA, a qual é caracterizada pela formação de bandas de arraste, sendo que bandas límpidas e bem visíveis são indicadoras de baixa degradação do DNA (ROSA, 2008).

Com base nisso, através de análise em espectrofotometria, pode-se averiguar a qualidade das amostras de DNA da Extração 1. Dentre as 42 amostras, valores de relação A260/A280 nm menores que 1,8, entre 1,8 e 2,0 e superiores a 2,0 foram verificadas em 8, 21 e 13 amostras (TABELA 4), respectivamente, indicando que 50% das amostras tiveram uma possível contaminação. A integridade do DNA foi confirmada em gel de agarose 1% (FIGURA 4 e 5), não sendo verificado a formação de bandas de arraste.

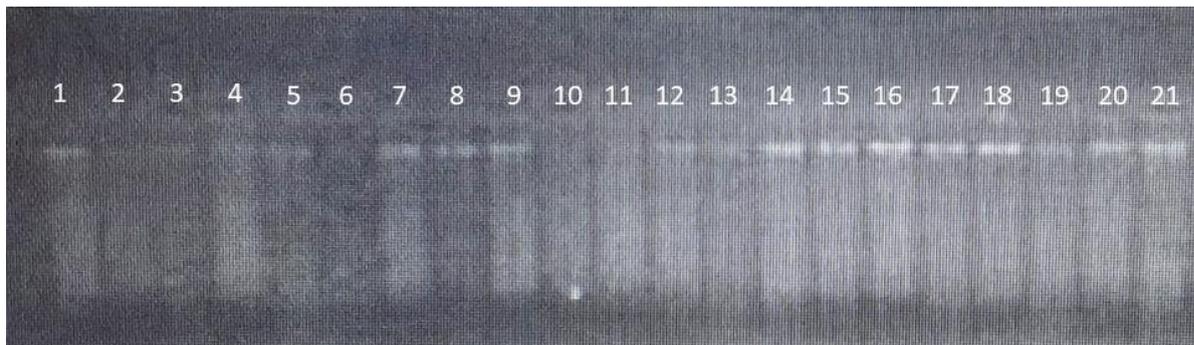
TABELA 4 - QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 1 POR ESPECTROFOTOMETRIA

Código Amostra DNA	ng/ μ L	A260/A280	Código Amostra DNA	ng/ μ L	A260/A280
1.1	219,7	1,60	8.1	325,8	1,90
1.2	104,0	1,90	8.2	269,1	1,79
1.3	46,5	2,05	8.3	61,1	1,65
2.1	140,4	1,93	9.1	49,4	1,85
2.2	78,5	1,22	9.2	63,6	1,85
2.3	366,5	1,51	9.3	123,6	1,96
3.1	809,9	1,86	10.1	40,5	2,13

3.3	623,3	1,77	10.3	854,8	2,10
4.1	467,9	1,76	11.1	51,6	1,85
4.2	148,2	1,86	11.2	81,0	1,97
4.3	78,4	2,14	11.3	111,4	2,01
5.1	33,2	2,26	12.1	19,3	1,96
5.2	70,8	1,89	12.2	49,4	2,04
5.3	60,2	1,88	12.3	934,1	2,07
6.1	58,0	2,26	13.1	100,7	2,03
6.2	72,0	1,89	13.2	56,9	1,91
6.3	60,2	1,88	13.3	243,1	2,02
7.1	60,5	1,99	14.1	77,8	1,45
7.2	66,2	2,03	14.2	254,3	1,98
7.3	81,4	1,91	14.3	113,7	1,95

Fonte: O Autor (2024).

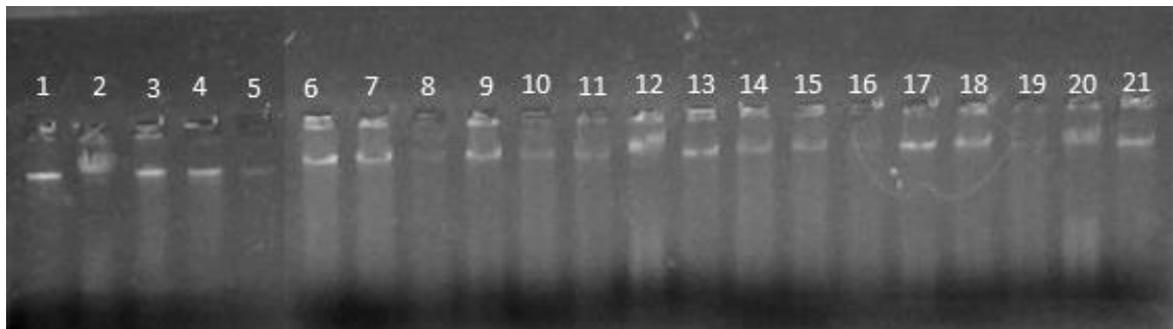
FIGURA 5 - AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA GENÔMICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 1



Fonte: O Autor (2024).

Poço: (Amostra); 1: (11.2); 2: (10.1); 3: (11.3); 4: (7.2); 5: (13.3); 6: (9.1); 7: (14.3); 8: (7.1); 9: (9.3); 10: (14.1); 11: (11.1); 12: (12.1); 13: (10.2); 14: (13.3); 15: (9.2); 16: (14.2); 17: (7.3); 18: (13.1); 19: (13.2); 20: (12.2); 21: (12.3).

FIGURA 6 - AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA GENÔMICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 1



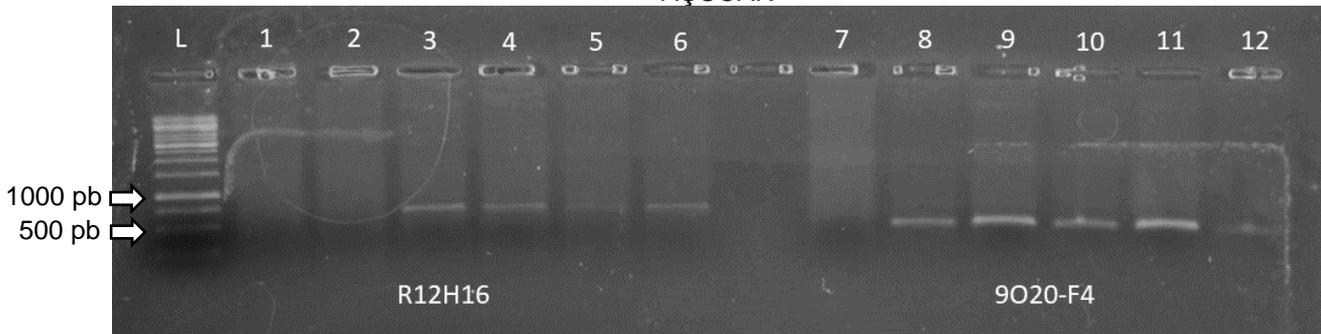
Fonte: O Autor (2024).

Poço: (Amostra); 1: (5.1); 2: (5.2); 3: (5.3); 4: (6.1); 5: (6.2); 6: (6.3); 7: (8.1); 8: (8.2); 9: (8.3); 10: (1.1); 11: (1.2); 12: (1.3); 13: (2.2); 14: (2.3); 15: (3.1); 16: (3.2); 17: (3.3); 18: (4.1); 19: (4.2); 20: (4.3); 21: (2.1).

4.2 AMPLIFICAÇÃO TESTE DOS OLIGONUCLETÍDEOS INICIADORES R12H16 E 9O20-F4

Através da reação teste de PCR, pôde-se confirmar o adequado funcionamento dos pares de primers, visto que houve a ausência e presença da amplificação do marcador R12H16 para o controle negativo e positivo, respectivamente, assim como houve a amplificação do marcador 9O20-F4 para ambos os controles (FIGURA 7). A partir disso, prosseguiu-se com a avaliação das demais amostras.

FIGURA 7 - REAÇÃO DE PCR PARA AVALIAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DOS OLIGONUCLETÍDEOS INICIADORES R12H16 E 9O20-F4 PARA GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR



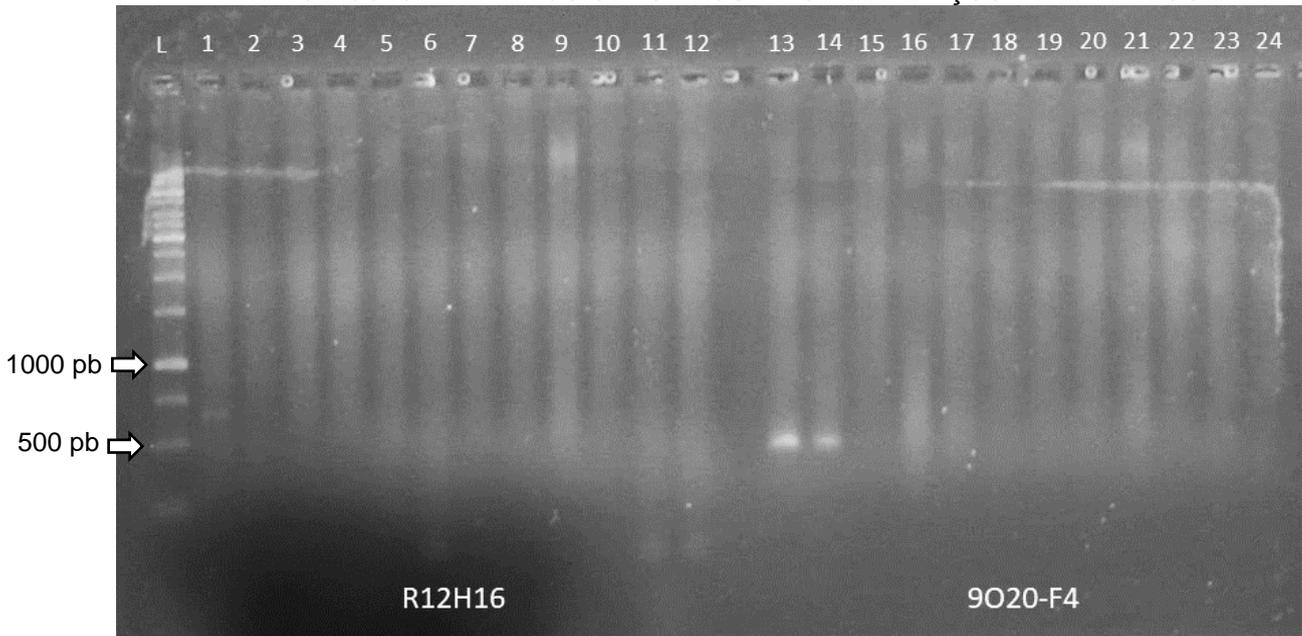
Fonte: O Autor (2024).

L: ladder (1 kb); Poço: (Amostra); 1: (branco); 2: (12.2); 3: (13.1); 4: (7.3); 5: (9.2); 6: (14.3); 7: (branco); 8: (12.2); 9: (13.1); 10: (7.3); 11: (9.2); 12: (14.3).

4.3 INCONSISTÊNCIA NAS REAÇÕES DE PCR

Posteriormente a reação teste de PCR, deu-se continuidade à avaliação dos demais genótipos não verificados. Entretanto, apesar da aplicação do mesmo protocolo, foi observado a ausência de amplificação para todas as amostras analisadas (FIGURA 8).

FIGURA 8 - AUSÊNCIA DE BANDAS CORRESPONDENTES AOS MARCADORES MOLECULARES R12H16 E 9O20-F4 PARA OS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR AVALIADOS



Fonte: O Autor (2024).

L: ladder (1 kb); Poço: (Amostra); 1: (7.3); 2: (12.2); 3: (branco); 4: (1.3); 5: (2.2); 6: (3.3); 7: (4.3); 8: (5.1); 9: (6.1); 10: (8.3); 11: (10.3); 12: (11.2); 13: (7.3); 14: (12.2); 15: (branco); 16: (1.3); 17: (2.2); 18: (3.3); 19: (4.3); 20: (5.1); 21: (6.1); 22: (8.3); 23: (10.3); 24: (11.2).

A ausência de bandas em gel pode apresentar diversas causas durante a reação de PCR, sendo as principais: quantidade insuficiente de DNA ou excesso deste, baixa qualidade do DNA ou presença de inibidores, concentração de primer baixa ou desequilibrada, primers velhos, presença de nucleases, descongelamento e homogeneização inadequada dos reagentes antes e durante o uso, funcionamento inadequado do termociclador, temperatura de anelamento muito alta, temperatura de desnaturação abaixo do ideal, tempo de extensão muito curto, número de ciclos abaixo do ideal (MERCK, 2024; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2024).

Através da espectrofotometria e da reação teste de PCR, confirmou-se a qualidade e a integridade das amostras de DNA e dos primers, respectivamente. Desta forma, acredita-se que a possível causa da ausência de bandas tenha sido o kit de PCR. Com base nisso, buscou-se testar outros kits, da mesma marca, a fim de verificar a possibilidade de um problema inerente ao produto (lote) utilizado. Entretanto, após uma sequência ininterrupta de tentativas e erros, optou-se por substituir o produto Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen) pelo PCR MasterMix (Promega). A partir da troca, foi realizado um teste com o PCR MasterMix (Promega) com amostras padronizadas da Extração 1, contudo, houve novamente a ausência de bandas. Considerando o resultado, criou-se uma nova hipótese. Durante os testes de

verificação dos kits Platinum® PCR SuperMix (Invitrogen), podem ter ocorrido alterações nas amostras de DNA, havendo múltiplas causas, como: manuseio e armazenamento inadequado das amostras, período de armazenamento muito longo, inúmeros ciclos de congelamento e descongelamento e a presença de contaminantes e nucleases (COSTA; MOURA, 2001; THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2024).

Segundo OLIVEIRA *et al.* (2007), o manuseio das amostras de DNA deve, de preferência, sempre ser feito com o auxílio de luvas, a fim de proteger os ácidos nucleicos contra a ação de nucleases e enzimas, as quais se encontram nos fluídos corporais liberados principalmente pelas mãos humanas. Além disso, para adequada conservação das amostras, recomenda-se o armazenamento destas em temperaturas de -20 a -80 °C, assim como o fracionamento em pequenas alíquotas, visando evitar sucessivos descongelamentos e, conseqüentemente, a contribuição para a oxidação e degradação do DNA.

SHAO *et al.* (2012), estudando o efeito do congelamento/descongelamento sobre a estabilidade de DNA genômico, verificaram que o material genético acaba sofrendo degradação, sendo tal fenômeno proporcional ao número consecutivo de ciclos de congelamento/descongelamento e ao tamanho do DNA isolado, sendo os fragmentos maiores os mais suscetíveis. Além disso, observou-se também que o armazenamento de amostras com altas concentrações de DNA (100 mg/mL) proporciona um efeito protetivo brando sobre a estabilidade se comparado a menores concentrações (10 mg/mL).

Conforme DEMEKE; JENKINS (2010) e SCHRADER *et al.* (2012), as reações de PCR ainda podem ser inviabilizadas pela presença de contaminantes nas amostras de DNA, oriundos do próprio tecido vegetal, como polifenóis e polissacarídeos, ou dos reagentes utilizados durante o protocolo de extração, como ácido etilendiamino tetraacético (EDTA), etanol, isopropanol e o pó de luvas. A ação inibitória pode estar relacionada com a precipitação ou a desnaturação do DNA, quelação do íon magnésio e ligação ou interferência na atividade da Taq DNA polimerase.

Considerando as possibilidades acima citadas, realizou-se uma reavaliação das amostras padronizadas em espectrofotometria (TABELA 5). As amostras de código 9, 13 e 14 não foram padronizadas devido a amplificação na reação teste de PCR dos marcadores R12H16 e 9O20-F4. Já o controle negativo, CTC4 (12), não foi reavaliado devido ao baixo volume das amostras.

TABELA 5 - REAVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE AMOSTRAS DE DNA DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 1

Primeira Quantificação			Segunda Quantificação		
Cód. Amostra DNA	ng/ μ L	A260/A280	Cód. Amostra DNA	ng/ μ L	A260/A280
1.3	46,5	2.05	1.3	61,9	2.13
2.2	78,5	1.22	2.2	25,9	1.15
3.3	623,3	1.77	3.3	24,4	0.79
4.3	78,4	2.14	4.3	146,1	1.57
5.1	33,2	2.26	5.1	92,6	2.40
6.2	72,0	1.89	6.2	139,3	1.35
7.2	66,2	2.03	7.2	84,2	1.50
8.3	61,1	1.65	8.3	38,6	0.54
10.2	32,1	2.04	10.2	100,6	1.33
11.2	81,0	1.97	11.2	19,7	0,53

Fonte: O Autor (2024).

Das onze amostras reavaliadas, nove apresentaram uma diminuição na relação A260/A280 nm, sendo elas: 2.2; 3.3; 4.3; 6.2; 7.2; 8.3; 10.2 e 11.2, indicando uma perda da qualidade. Em relação a concentração, as amostras 2.2; 3.3; 8.3 e 11.2 apresentaram uma redução, enquanto nas demais se observou um aumento considerável. Esta situação foi verificada também por MARTINEZ *et al.* (2018), os quais, estudando o efeito da temperatura na conservação do DNA, observaram um aumento evidente na concentração de algumas das amostras analisadas, alegando que tal aumento pode estar atrelado à evaporação do Tris-EDTA (TE), solvente da amostra do DNA, devido ao processo de congelamento/descongelamento.

A partir dos resultados obtidos, optou-se por fazer uma nova extração de DNA (Extração 2).

4.4 QUANTIFICAÇÃO E INTEGRIDADE DO DNA EXTRAÍDO (EXTRAÇÃO 2)

A fim de aperfeiçoar a pureza das amostras de DNA, uma possibilidade é submeta-las a mais de um tratamento com clorofórmio. Tal composto químico, uma vez adicionado à mistura de extração, ajuda na formação de duas fases distintas: uma fase aquosa e outra orgânica. Na fase aquosa se concentra o DNA, devido a sua polaridade, enquanto na fase orgânica se encontram proteínas desnaturadas pela ação do clorofórmio. Apesar de purificar mais o DNA, a cada repetição, existe o risco proporcional de haver perdas de DNA (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Assim como feito para a Extração 1, por meio da análise em espectrofotometria, verificou-se a qualidade das amostras de DNA da Extração 2. Não foram verificados valores de relação A260/A280 nm superiores a 2,0, entretanto, mesmo após um segundo tratamento com clorofórmio, dentre as 42 amostras obtidas, apenas 14 acabaram apresentando valores entre 1,8 e 2,0, valores considerados ideais (TABELA 5).

TABELA 6 - QUANTIFICAÇÃO DE DNA DE AMOSTRAS DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 2 POR ESPECTROFOTOMETRIA

Código Amostra DNA	ng/ μ L	A260/A280	Código Amostra DNA	ng/ μ L	A260/A280
1.1	28,0	1.53	8.1	20,6	1.81
1.2	28,2	1.64	8.2	21,7	1.99
1.3	18,8	1.62	8.3	27,2	1.89
2.1	18,1	1.38	9.1	30,9	1.94
2.2	11,6	1.14	9.2	25,5	1.89
2.3	11,8	1.24	9.3	35,2	1.92
3.1	19,7	1.39	10.1	17,2	1.86
3.2	15,0	1.29	10.2	15,1	1.87
3.3	161,8	1.78	10.3	14,3	1.36
4.1	39,4	1.75	11.1	34,8	1.94
4.2	20,4	1.51	11.2	15,3	1.61
4.3	20,7	1.52	11.3	16,4	1,74
5.1	29,7	1.63	12.1	23,7	1.87
5.2	19,0	1.55	12.2	41,7	1.38
5.3	26,2	1.46	12.3	40,2	1.48
6.1	18,0	1.76	13.1	17,2	1.79
6.2	12,6	1.79	13.2	18,4	1.85
6.3	13,5	1.67	13.3	34,1	1.91
7.1	15,3	1.40	14.1	32,4	1.94
7.2	22,2	1.64	14.2	24,2	1.75
7.3	33,5	1.94	14.3	10,0	1.36

Fonte: O Autor (2024).

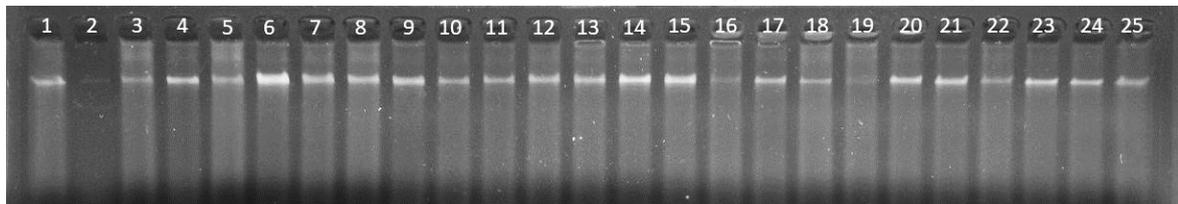
A taxa considerável de amostras, com a relação A260/A280 nm abaixo de 1,8, ainda indica ter havido contaminação por proteínas. Tal fato pode estar relacionado com a etapa de transferência, durante o protocolo de extração, do sobrenadante de um microtubo para um novo. Por ser um processo manual, a eficácia da etapa acaba dependendo da precisão da pessoa operante, sendo importante durante a

transferência evitar tocar a interface com a ponta da ponteira, assim como transferir o sobrenadante misturado com a fase orgânica (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Em relação a concentração de DNA das amostras, verificou-se uma baixa quantidade se comparado a extração realizada por CENSI (2017), cujos valores variaram entre 100 e 5000 ng/μL. Nesta extração, observou-se uma concentração média de 23 ng/μL, havendo apenas uma amostra com valor superior a 100 ng/μL. Possivelmente, as concentrações iniciais das amostras já eram baixas, sendo reduzidas pelo segundo tratamento com clorofórmio.

Posteriormente a quantificação das amostras, confirmou-se a integridade do DNA em gel de agarose 1% (FIGURA 8 e 9), não sendo constatado a formação de bandas de arraste. Entretanto, observou-se que certas amostras com uma baixa relação A260/A280 nm, como a 2.3 (1.24), apresentaram bandas mais nítidas que aquelas com uma relação superior, como a amostra 11.1 (1.94). Tal fenômeno pode ter ocorrido devido a um erro de pipetagem e/ou homogeneização, das amostras originais, durante o processo de padronização para uma concentração de DNA de 10 ng/μL.

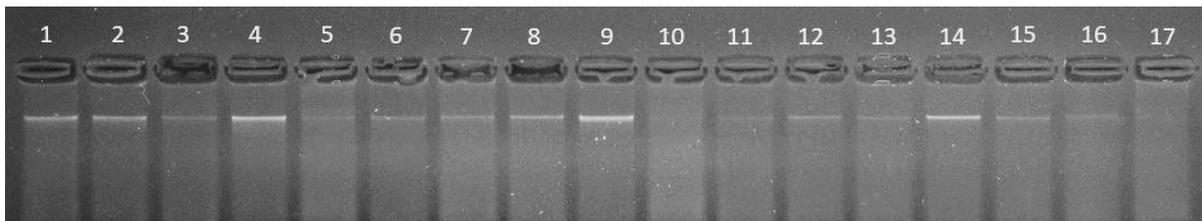
FIGURA 9 - AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA GENÔMICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 2



Fonte: O Autor (2024).

Poço: (Amostra); 1: (1.1); 2: (1.2); 3: (1.3); 4: (2.1); 5: (2.2); 6: (2.3); 7: (3.1); 8: (3.2); 9: (3.3); 10: (4.1); 11: (4.2); 12: (4.3); 13: (5.1); 14: (5.2); 15: (5.3); 16: (6.1); 17: (6.2); 18: (6.3); 19: (7.1); 20: (7.2); 21: (7.3); 22: (8.1); 23: (8.2); 24: (8.3); 25: (9.1).

FIGURA 10 - AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA GENÔMICO EM GEL DE AGAROSE 1% DAS AMOSTRAS DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DA EXTRAÇÃO 2



Fonte: O Autor (2024).

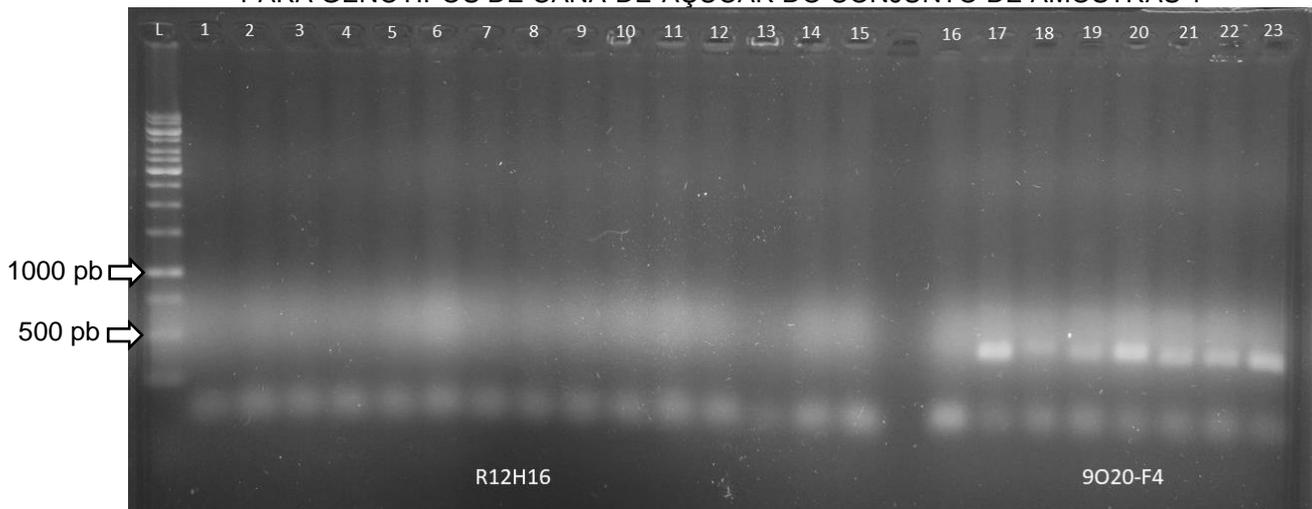
Poço: (Amostra); 1: (9.2); 2: (9.3); 3: (10.1); 4: (10.2); 5: (10.3); 6: (11.1); 7: (11.2); 8: (11.3); 9: (12.1); 10: (12.2); 11: (12.3); 12: (13.1); 13: (13.2); 14: (13.3); 15: (14.1); 16: (14.2); 17: (14.3).

A partir da avaliação do gel de integridade do DNA, separou-se as amostras em três conjuntos conforme a qualidade, sendo o Conjunto de Amostras 1 (1.1; 2.3; 3.1; 4.1; 5.3; 6.2; 7.3; 8.2; 9.1; 10.2; 11.3; 12.1; 13.3; 14.1) e 2 (1.3; 2.1; 3.3; 4.3; 5.2; 6.3; 7.2; 8.3; 9.2; 10.1; 11.2; 12.3; 13.2; 14.2), amostras superiores, e a 3 (1.2; 2.2; 3.2; 4.2; 5.1; 6.1; 7.1; 8.1; 9.3; 10.3; 11.1; 12.2; 13.1; 14.3), intermediárias.

4.5 REAÇÕES DE PCR COM AMOSTRAS DA EXTRAÇÃO 2

Utilizando o Conjunto de Amostras 1, realizou-se uma reação de PCR sendo testado os marcadores moleculares R12H16 e 9O20-F4 para todos os genótipos (FIGURA 11 e 12). A partir dos resultados, observou-se que houve a amplificação do marcador 9O20-F4 para todas as amostras, fato que não ocorreu com o marcador R12H16, cuja amplificação não foi verificada mesmo para o controle positivo (7.3).

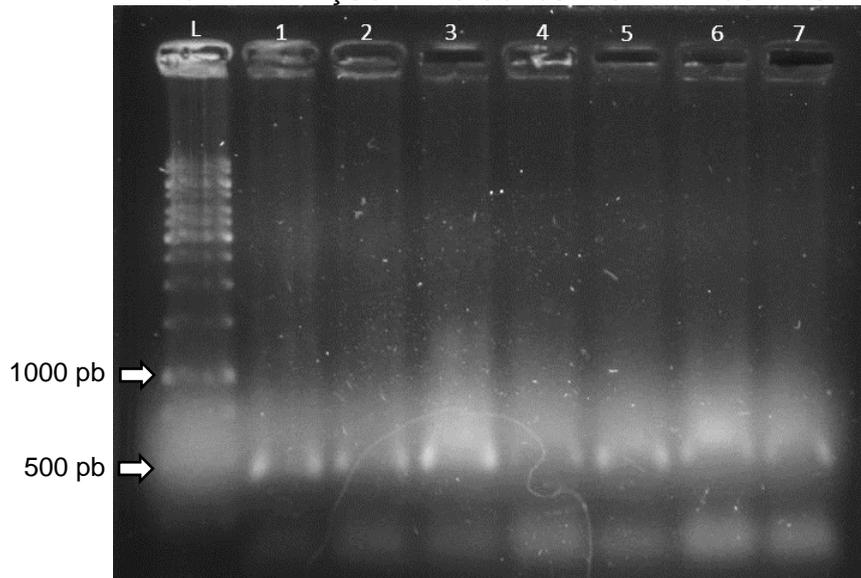
FIGURA 11 - REAÇÃO DE PCR COM OS MARCADORES MOLECULARES R12H16 E 9O20-F4 PARA GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 1



Fonte: O Autor (2024).

L: ladder (1 kb); Poço: (Amostra); 1: (branco); 2: (1.1); 3: (2.3); 4: (3.1); 5: (4.1); 6: (5.3); 7: (6.1); 8: (7.3); 9: (8.2); 10: (9.1); 11: (10.2); 12: (11.3); 13: (12.1); 14: (13.3); 15: (14.1); 16: (branco); 17: (1.1); 18: (2.3); 19: (3.1); 20: (4.1); 21: (5.3); 22: (6.1); 23: (7.3).

FIGURA 12 - REAÇÃO DE PCR COM O MARCADOR MOLECULAR 9O20-F4 PARA GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 1

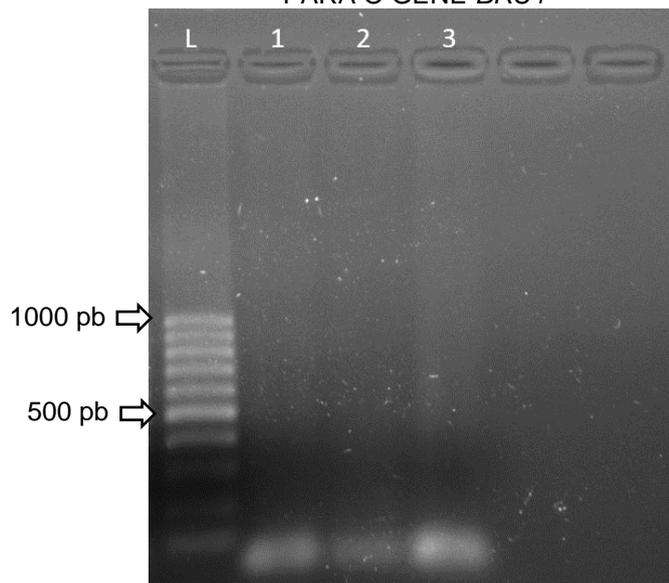


Fonte: O Autor (2024).

L: ladder (1 kb); Poço: (Amostra); 1: (8.2); 2: (9.1); 3: (10.2); 4: (11.3); 5: (12.1); 6: (13.3); 7: (14.1).

Considerando a possibilidade de ter havido um erro de preparo dos reagentes para a PCR, realizou-se mais uma reação apenas para o marcador R12H16, sendo utilizado a triplicata do controle positivo (7.1, 7.2 e 7.3) (FIGURA 13).

FIGURA 13 - REAÇÃO DE PCR PARA AVALIAÇÃO DO FUNCIONAMENTO DO MARCADOR MOLECULAR R12H16 PARA A TRIPLICATA DO CONTROLE POSITIVO DE CANA-DE-AÇÚCAR PARA O GENE *BRU1*



Fonte: O Autor (2024).

L: ladder (100 bp); Poço: (Amostra); 1: (7.1); 2: (7.2); 3: (7.3).

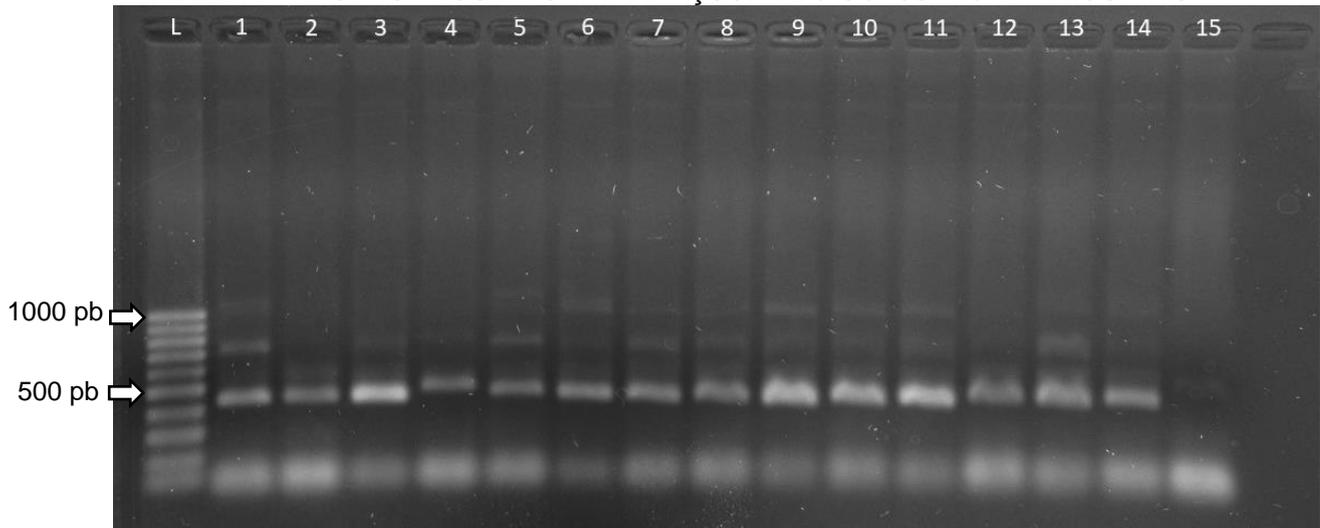
A partir do resultado acima, observou-se que não houve novamente à amplificação do marcador R12H16 para a triplicata. Para tal situação, desconsiderou-se a possibilidade de ter havido um problema com as amostras de DNA, uma vez que houve a amplificação do marcador 9O20-F4 para a amostra 7.3. Desta forma, acredita-se que o par de primers R12H16 possa ter sofrido alguma alteração durante os seus diversos usos.

Entre as possíveis causas para tal alteração, acredita-se que neste trabalho hajam duas principalmente: primers velhos e/ou degradação dos primers. Oligonucleotídeos iniciadores liofilizados são estáveis a -20 °C por pelo menos 1 ano, ao passo que aqueles dissolvidos em TE e água livre de nucleases duram no mínimo seis meses a -20 °C (THERMO FISHER SIENTIFIC, 2024). Acredita-se que os primers utilizados neste trabalho tinham cerca de 3 anos, sendo armazenados em freezer a -20 °C. Além disso, por serem pequenos fragmentos sintéticos de DNA, assim como o DNA genômico, os primers podem sofrer degradação devido a ciclos sucessivos de congelamento/descongelamento, situação que ocorreu durante o desenvolvimento dos testes de PCR.

4.6 AMPLIFICAÇÃO DO MARCADOR 9O20-F4 E DIGESTÃO COM ENZIMA RSAL

Considerando a perda da funcionalidade do marcador R12H16, decidiu-se prosseguir o trabalho avaliando os genótipos apenas com o marcador 9O20-F4, sendo realizado reações de PCR com o Conjunto de Amostras 1, 2 e 3 separadamente (FIGURA 14, 15 e 16).

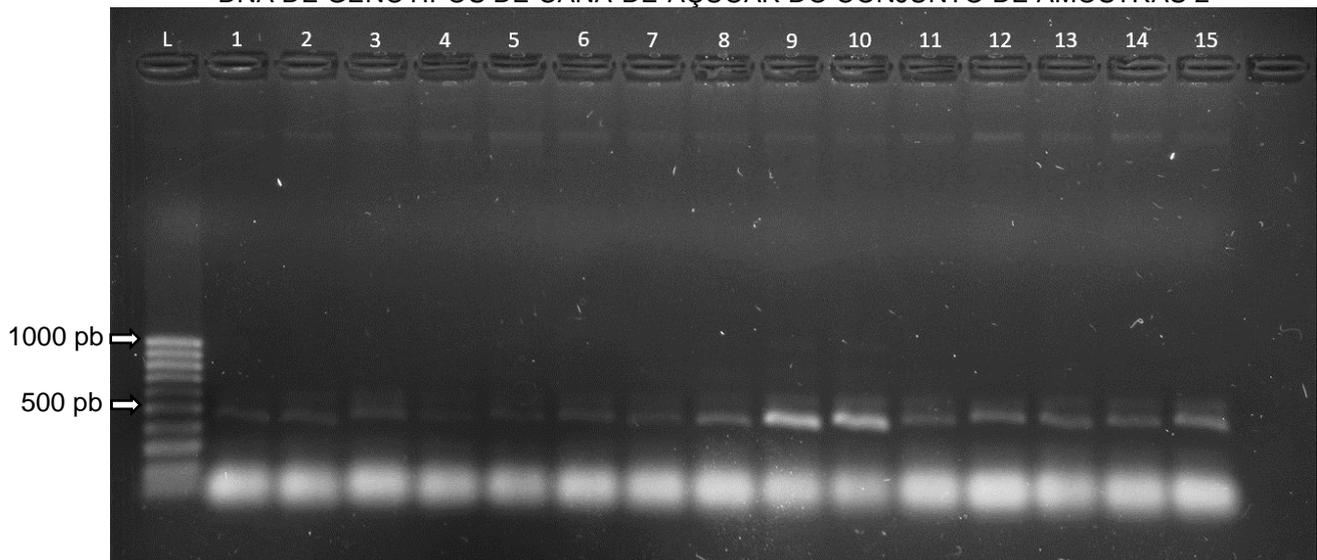
FIGURA 14 - REAÇÃO DE PCR COM O MARCADOR MOLECULAR 9O20-F4 COM AMOSTRAS DE DNA DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 1



Fonte: O Autor (2024).

L: ladder (100 bp); Poço: (Amostra); 1: (12.1); 2: (7.3); 3: (1.1); 4: (2.3); 5: (3.1); 6: (4.1); 7: (5.3); 8: (6.1); 9: (8.2); 10: (9.1); 11: (10.2); 12: (11.3); 13: (13.3); 14: (14.1); 15: (branco).

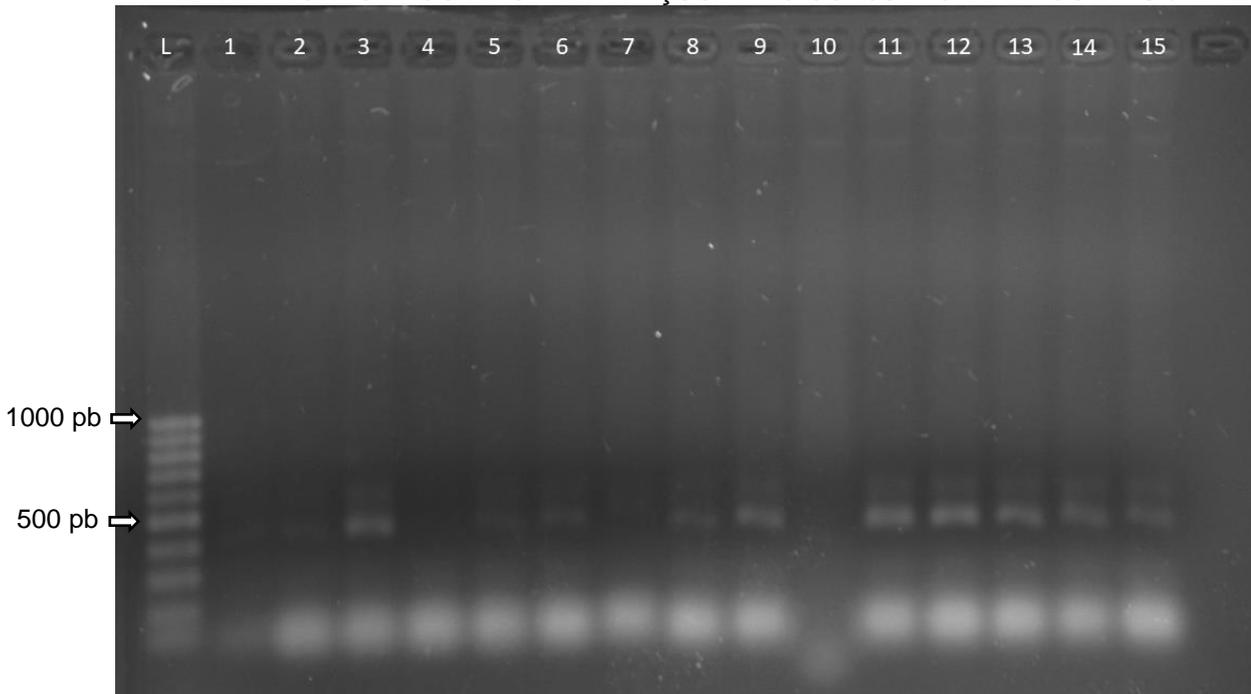
FIGURA 15 - REAÇÃO DE PCR COM O MARCADOR MOLECULAR 9O20-F4 COM AMOSTRAS DE DNA DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 2



Fonte: O Autor (2024).

L: ladder (100 bp); Poço: (Amostra); 1: (12.3); 2: (7.2); 3: (1.3); 4: (2.1); 5: (3.3); 6: (4.3); 7: (5.2); 8: (6.3); 9: (8.3); 10: (9.2); 11: (10.1); 12: (11.2); 13: (13.2); 14: (14.2); 15: (branco).

FIGURA 16 - REAÇÃO DE PCR COM O MARCADOR MOLECULAR 9O20-F4 COM AMOSTRAS DE DNA DE GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 3



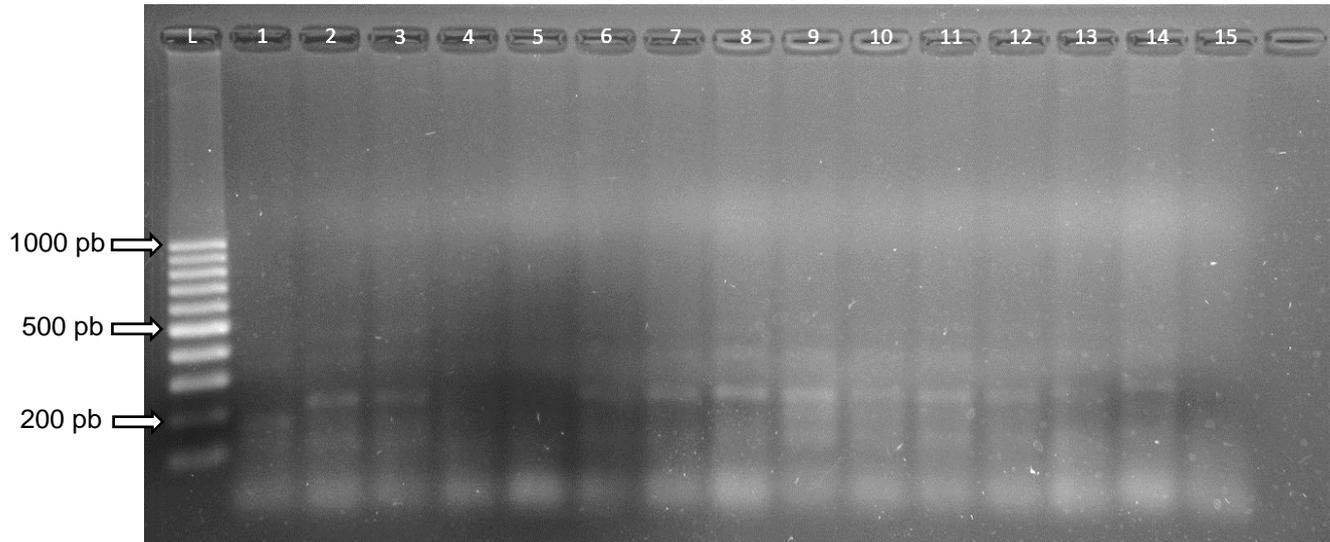
Fonte: O Autor (2024).

L: ladder (100 bp); Poço: (Amostra); 1: (12.2); 2: (7.1); 3: (1.2); 4: (2.2); 5: (3.2); 6: (4.2); 7: (5.1); 8: (6.1); 9: (8.1); 10: (9.3); 11: (10.3); 12: (11.1); 13: (13.1); 14: (14.3); 15: (branco).

A partir da reação de PCR dos três conjuntos, observou-se a amplificação do marcador para todas as amostras avaliadas no Conjunto de Amostras 1 e 2, corroborando com os resultados encontrados por WANG *et al.* (2017). No Conjunto de Amostras 3, verificou-se que as amostras 2.2, 5.1 e 9.3 não apresentaram amplificação, fato previsto já que era constituído por amostras de menor qualidade. Além disso, observou-se que as amostras branco dos Conjunto de Amostras 2 e 3 apresentaram amplificação, situação divergente ao esperado, uma vez que são caracterizadas pela ausência de DNA durante seu preparo. Possivelmente, a causa tenha sido uma contaminação cruzada.

Considerando a qualidade de cada conjunto e os resultados acima, optou-se por dar prosseguimento ao processo de digestão com a enzima de restrição RsaI, dos produtos de PCR do marcador 9O20-F4, apenas com o Conjunto de Amostras 1 e 2 (FIGURA 17 e 18), sendo utilizado a amostra branco do Conjunto de Amostras 1 para ambas as digestões.

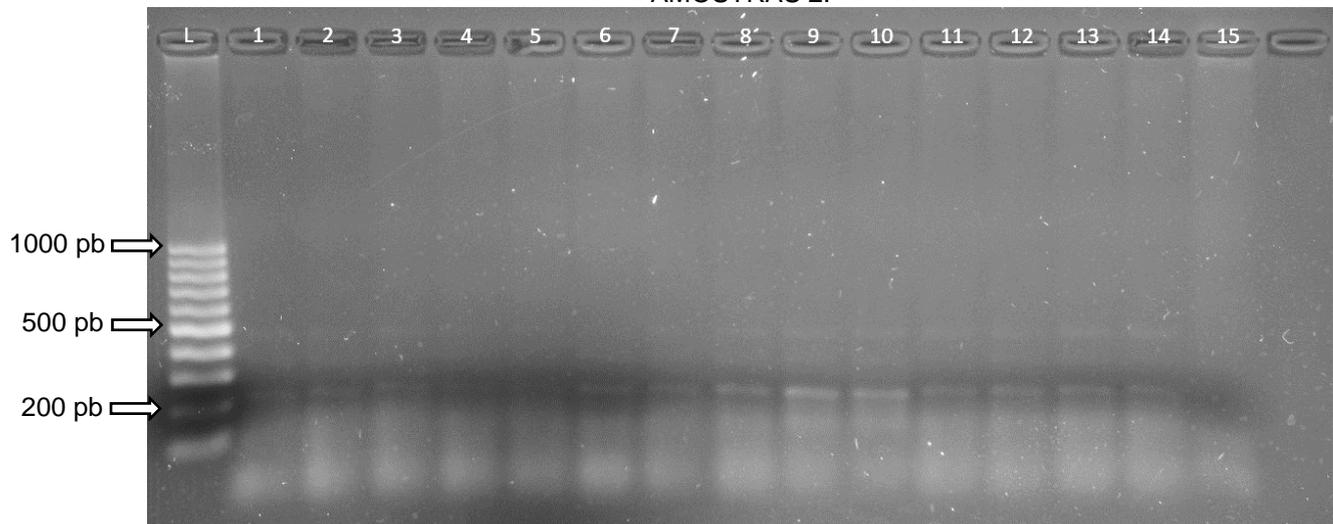
FIGURA 17 - DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO RSAI DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE PCR DO MARCADOR 9O20-F4 DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 1



Fonte: O Autor (2024).

L: ladder (100 bp); Poço: (Amostra); 1: (12.1); 2: (7.3); 3: (1.1); 4: (2.3); 5: (3.1); 6: (4.1); 7: (5.3); 8: (6.1); 9: (8.2); 10: (9.1); 11: (10.2); 12: (11.3); 13: (13.3); 14: (14.1); 15: (branco).

FIGURA 18 - DIGESTÃO COM ENZIMA DE RESTRIÇÃO RSAI DOS PRODUTOS DA REAÇÃO DE PCR DO MARCADOR 9O20-F4 DOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR DO CONJUNTO DE AMOSTRAS 2.



Fonte: O Autor (2024).

L: ladder (100 bp); Poço: (Amostra); 1: (12.3); 2: (7.2); 3: (1.3); 4: (2.1); 5: (3.3); 6: (4.3); 7: (5.2); 8: (6.3); 9: (8.3); 10: (9.2); 11: (10.1); 12: (11.2); 13: (13.2); 14: (14.2); 15: (branco).

4.7 FREQUÊNCIA DO MARCADOR 9O20-F4-RSAL NOS GENÓTIPOS DE CANA-DE-AÇÚCAR

A presença do marcador molecular 9O20-F4-Rsal foi verificada em 11 dos 14 genótipos avaliados, não sendo observado para o controle negativo e para os genótipos RB116931 (2.3, 2.1) e RB066443 (3.1, 3.3). Quanto ao genótipo RB116931,

esperava-se um resultado positivo para a amplificação, visto que BORELLA *et al.* (2021), após a análise do gene *Bru1* em 64 genótipos de cana, confirmaram o aspecto resistente do parental RB855113, sendo o outro parental de RB116931, portanto, possivelmente um indivíduo suscetível.

Apesar da resistência à ferrugem marrom ser transmitida com eficácia (HOGARTH *et al.*, 1983; SORDI *et al.*, 1988), pôde-se confirmar que a presença somente de um parental resistente não garantirá sempre uma progênie com a mesma característica, no entanto, é possível. Tal situação foi verificada também por BORELLA *et al.* (2021), os quais observaram que o próprio genótipo RB855113, apresentava um parental suscetível (SP70-1143) e um resistente (RB72454). O mesmo pôde ser analisado no presente trabalho para os genótipos RB046222 (4.1, 4.3) e RB076553 (13.2, 13.3), os quais apresentaram amplificação para o marcador 9O20-F4-Rsal, apesar de possuírem um parental suscetível, conforme CENSI (2017), sendo eles: SP80-1842 e SP70-1143, respectivamente.

Embora a presença do marcador 9O20-F4-Rsal nos genótipos avaliados seja um indício, não se pôde confirmar o caráter resistente à ferrugem marrom para todos os indivíduos avaliados. Comumente, a validação da resistência é feita mediante a amplificação tanto do marcador R12H16 como do 9O20-F4-Rsal (RACEDO *et al.*, 2013; CENSI, 2017; LI *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2021). Tal situação foi verificado para os genótipos RB076553, RB046215 e RB116969, visto que apresentaram a amplificação para ambos os marcadores, indicando a presença do gene *Bru1* (TABELA 7). Entretanto, existe a possibilidade de ocorrer a amplificação para apenas um dos marcadores.

TABELA 7 - GENOTIPAGEM DAS CULTIVARES DE CANA-DE-AÇÚCAR QUANTO A PRESENÇA OU AUSÊNCIA DOS MARCADORES MOLECULARES R12H16 E 9O20-F4-RSAI

Clone/Cultivar	R12H16	9O20-F4-Rsal
RB867515 (+)	+	+
CTC4 (-)	?	-
RB056351	?	+
RB056380	?	+
RB046215	+	+
RB046222	?	+
RB066443	?	-
RB076537	?	+
RB076553	+	+
RB116922	?	+

RB116931	?	-
RB116948	?	+
RB116966	?	+
RB116969	+	+

Fonte: O Autor (2024).

(+): presença, (-): ausência, ?: não avaliado.

BARRETO *et al.* (2017), avaliando a eficiência dos marcadores moleculares R12H16 e 9O20-F4-Rsal na predição de resistência à ferrugem marrom, verificaram que de 14 variedades RB, duas apresentaram amplificação para apenas um dos marcadores. A variedade RB806043 demonstrou amplificação apenas para o marcador R12H16, ao passo que a variedade RB835089, apenas para o marcador 9O20-F4-Rsal, sendo classificadas como suscetível e resistente, respectivamente.

Situação semelhante foi observada por NEUBER (2015) durante investigação da presença do gene *Bru1* em 386 acessos de cana-de-açúcar. Conforme os resultados, verificou-se que 8 genótipos foram positivos apenas para o marcador R12H16, apresentando diferentes graus de susceptibilidade à doença. Apesar disso, através de uma análise de correlação entre a presença dos marcadores e a severidade da ferrugem marrom, confirmou-se que a existência de apenas um marcador, seja R12H16 ou 9O20-F4-Rsal, proporciona uma redução da severidade da doença e, portanto, rumo à resistência.

Não obstante a genotipagem permita identificar genes e marcadores relacionados a características de interesse, a expressão gênica pode variar conforme fatores bióticos e abióticos. Com base nisso, concomitante à genotipagem, torna-se importante a realização da fenotipagem dos indivíduos avaliados, visto que este processo possibilita confirmar se as previsões realizadas com base na genotipagem realmente se manifestam no campo. Dentro disso, tem-se a avaliação e quantificação de doenças fitopatogênicas, sendo alguns dos objetivos o auxílio em estudos de métodos de controle, analisando a eficiência de produtos químicos ou a resistência varietal, bem como a construção de modelos estatísticos que estimam o progresso e os danos de doenças (ALMEIDA, 2022). No caso da ferrugem marrom, sua quantificação é feita geralmente se estimando a severidade por meio de escalas diagramáticas, sendo a mais utilizada atualmente, a proposta por AMORIM *et al.* (1987) (BARRETO *et al.*, 2017; KOCH, 2020; BORELLA *et al.*, 2021).

NEUBER (2015), avaliando a severidade da ferrugem marrom em 94 genótipos de cana-de-açúcar, verificou que 77% das cultivares que possuíam os marcadores relacionados ao gene *Bru1* foram classificadas como resistentes, enquanto os outros 23%, apesar do diagnóstico negativo para o gene, apresentaram caráter resistente também, sendo tal fenômeno observado por outros autores (PARCO *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2017; BORELLA *et al.*, 2021). A partir disso, inferiu-se a possibilidade de outra fonte de resistência, como verificado por RABOIN *et al.* (2006), os quais verificaram a existência de um segundo gene maior de resistência (*Bru2*) na cultivar australiana MQ76-53, sendo o gene responsável pelo controle da esporulação do fungo na folha. Tal fato é considerado de elevada relevância para os programas de melhoramento de cana-de-açúcar, uma vez que fontes alternativas de resistência podem ser introduzidas e combinadas com o gene *Bru1*, aumentando a eficiência e a durabilidade contra a ferrugem marrom.

Desta forma, fica claro a importância da fenotipagem, uma vez que a utilização da genotipagem isoladamente não proporcionaria a descoberta de possíveis novas fontes de resistência. Além do mais, conforme COSTET *et al.* (2012), exceções com a presença do marcador R12H16 e 9O20-F4-Rsal em variedades suscetíveis poderiam indicar a existência de diferentes raças de *P. melanocephala* e, conseqüentemente, quebra de resistência.

5 CONCLUSÃO

A reação de PCR, embora seja uma técnica reconhecida por sua simplicidade, facilidade e praticidade, envolve diversos fatores, como a degradação dos primers e a contaminação de amostras, que podem comprometer o funcionamento adequado e, conseqüentemente, gerar resultados indesejados, conforme observado no presente estudo. Portanto, toda organização e precaução durante o manuseio e armazenamento dos reagentes são altamente recomendadas para uma maior precisão dos resultados.

Por meio da amplificação do marcador R12H16 e 9O20-F4-Rsal, dos 14 genótipos avaliados, 4 apresentaram o gene de resistência *Bru1*, sendo eles RB076553, RB046215, RB116969 e o controle positivo, RB867515. Para os demais genótipos, embora não tenha sido possível a verificação do marcador R12H16, existe a possibilidade de apresentarem o caráter resistente, frente à amplificação do marcador 9O20-F4-Rsal, com exceção dos genótipos RB116931, RB066443 e o controle negativo, CTC4, os quais não apresentaram amplificação para este marcador.

6 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para a obtenção de amostras de DNA de melhor qualidade, recomenda-se testar, além do clorofórmio, outros métodos de purificação de DNA, como a utilização de fenol tamponado, mistura de fenol com clorofórmio, uso de colunas de sílica e beads magnéticas (OLIVEIRA *et al.*, 2007; TSAI *et al.*, 2019; HAWKINS *et al.*, 2022; MOLBERT *et al.*, 2023).

Em relação às reações de PCR, recomenda-se o fracionamento das amostras de DNA, com o objetivo de evitar possíveis danos causados por ciclos repetidos de congelamento e descongelamento. Ademais, para confirmar o caráter resistente de cada genótipo avaliado, sugere-se a aquisição e o teste de um novo par de primers R12H16.

Paralelamente à genotipagem, é aconselhável realizar a avaliação dos genótipos, seja em casa de vegetação ou em campo, analisando a severidade da ferrugem marrom, a fim de verificar se as previsões baseadas na genotipagem correspondem aos resultados observados na prática.

REFERÊNCIAS

- ADAPAR – AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. Disponível em: <<https://www.adapar.pr.gov.br/>>.
- ALMEIDA, L. P. **Impacto do tamanho de parcelas na resposta de genótipos de cana-de-açúcar às ferrugens marrom e alaranjada em experimentos de campo 2022**. 44 p. Monografia (Curso de Engenharia Agrônômica) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2021.
- AMARAL, A. L.; SANTOS, J. M.; BARBOSA, G. V. S. **Denominação de cultivares de cana-de-açúcar como suporte à documentação e utilização do germoplasma conservado**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 31 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 196).
- AMORIM, L.; BERGAMIN FILHO A.; CARDOSO C.; MORAES, V. A.; FERNANDES C.R. Metodologia de avaliação da ferrugem da cana-de-açúcar (*Puccinia melanocephala*). **Boletim Técnico Copersucar**, v. 39, n. 1, p. 13-16, 1987.
- ASNAGHI, C.; D'HONT, A.; GLASZMANN, J. C.; ROTT, P. Resistance of cultivar R570 to *Puccinia melanocephala* isolates from different geographic locations. **Plant Disease**, v.85, n. 3, p. 282-286, 2001.
- ASNAGHI, C.; ROQUES, D.; RUFFEL, S.; KAYE, C.; HOARAU, J-Y.; TELISMART, H.; GIRARD, J. C.; RABOIN, L. M.; RISTERUCCI, A. M.; GRIVET, L.; D'HONT, A. Targeted mapping of a sugarcane rust resistance gene (Bru1) using bulked segregant analysis and AFLP markers. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 108, n. 4, p. 759-764, 2004.
- AUGUSTO, R. **Instabilidade genética de variedades de cana-de-açúcar em diferentes estágios de corte e regiões de cultivo**. 2013. 96 p. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Maringá, Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento, Maringá, 2013.
- BARBOSA, M. C. A. **Identification of genes associated with resistance to brown rust in sugarcane and prevalence of one major gene**. 2016. 75 p. Dissertation (Doctorate) – Louisiana State University, Baton Rouge, 2016.
- BARRETO, F. Z.; BALSALOBRE, T. W. A.; CHAPOLA, R. G.; HOFFMANN, H. P.; CARNEIRO, M. S. Validação de marcadores moleculares associados à resistência à ferrugem marrom em cana-de-açúcar. **Summa Phytopathol**, v. 43, n. 1, p. 36-40, 2017.
- BERDING, N.; ROACH, B. T. Germplasm collection, maintenance, and use. *In*: HEINZ, D. J. (Ed). **Sugarcane improvement through breeding**. NY: Elsevier, 1987. p. 143-210.
- BORELLA, J.; PORTELA BRASILEIRO, B.; AZEREDO, A. A. C.; RUARO, L.; OLIVEIRA, R. A.; BESPALHOK FILHO, J. C. Reaction to brown rust and presence of

the *Bru1* gene in Brazil RIDESA sugarcane parents. **Sugar Tech**, v. 23, n. 5, p. 1037-1044, 2021.

CARDOSO, C. O. N.; SANGUINO, A. Ferrugem da cana-de-açúcar. *In*: 4º SEMINÁRIO DE TECNOLOGIA AGRONÔMICA COPERSUCAR, 4., Piracicaba, 1988. **Anais** [...]. Piracicaba: Ave Maria LTDA, 1988. p. 609-625.

CARLSSON, J.; DAVIDSSON, S.; FRIDFELDT, J.; GIUNCHI, F.; FIANO, V.; GRASSO, C.; ZELIC, R.; RICHIARDI, L.; ANDRÉN, O.; PETTERSSON, A.; FLORENTINO, M.; AKRE, O. Quantity and quality of nucleic acids extracted from archival formalina fixed paraffin embedded prostate biopsies. **BMC Medical Research Methodology**, v.18, n. 161, p. 1-12, 2018.

CENSI, S. **Presença do gene de resistência à ferrugem marro (*Bru1*) em variedades e clones de cana-de-açúcar**. 2017. 49 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Curitiba, 2017.

CESNIK, R.; MIOCQUE, J. **Melhoramento de cana-de-açúcar**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2004. 307 p.

CHAPOLA, R. G. **Reação de variedades de cana-de-açúcar à ferrugem alaranjada (*Puccinia kuehnii*)**. 2013. 77 p. Tese (Doutorado) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2013.

COMSTOCK, J. C., SHINE, J. M.; RAID, R. N. Effect of sugarcane rust on growth and biomass. **Plant Disease**. V. 76, p. 175–177, 1992.

COMSTOCK, J. C.; RAID, R. N. Sugarcane common rust. *In*: RAO, G. P.; GILLASPIE JR., A. G.; UPADHYAYA, P. P.; BERGAMIN FILHO, A.; AGNIHOTRI, V. P.; CHEN, C. T. (Eds.). **Current Trends in Sugarcane Pathology**. New Delhi: International Books and Periodical Supply Service, 1994. p. 1-10.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, DF, v. 11, n. 4, abril 2024. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>.

CONAB – COMPANHIA NACIONAL DE ABASTECIMENTO. **Acompanhamento da safra brasileira de cana-de-açúcar**. Brasília, DF, v. 12, n. 1, abril 2024. Disponível em: <<https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana>>.

COSTA, M. R.; MOURA, E. F. **Manual de extração de DNA**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2001. 24 p. (Embrapa Amazônia Oriental. Documentos, 89).

COSTET, L.; CUNFF, L. LE; ROYAERT, S.; RABOIN, L. M.; HERVOUET, C.; TOUBI, L.; TELISMART, H.; GARSMEUR, O.; ROUSSELLE, Y.; PAUQUET, J.; NIBOUCHE, S.; GLASZMANN, J. C.; HOARAU, J-Y.; D'HONT, A. Haplotype structure around *Bru1* reveals a narrow genetic basis for brown rust resistance in modern sugarcane cultivars. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 125, n. 5, p. 825-836, 2012.

CUMMINS, G.B. **The species of *Puccinia* parasitic on the Andropogoneae.** Uredineana. *Encycl. Mycol.* 4:5-89. 1953.

DAUGROIS, J. H.; GRIVET, L.; ROQUES, D.; HOARAU, J. Y.; LOMBARD, H.; GLASZMANN, J. C.; D'HONT, A. A putative major gene for rust resistance linked with an RFLP marker in sugarcane cultivar R570. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 92, p. 1059-1064, 1996.

DEMEKE, T.; JENKINS, R. Influence of DNA extraction methods, PCR inhibitors and qualification methods on real-time PCR assay of biotechnology-derived traits.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, v. 396, p. 1966-1990, 2010.

D'HONT, A.; SOUZA, G. M.; MENOSSI, M.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M-A.; GLASZMANN, J. C.; ULIAN, E. Sugarcane: a major source of sweetness, alcohol, and bio-energy. *In*: MOORE, P. H.; MING, R. **Genomics of Tropical Crop Plants.** NY: Springer New York, 2008. p. 483-514.

EPPO GLOBAL DATABASE – EUROPEAN AND MEDITERRANEAN PLANT PROTECTION ORGANIZATION. ***Puccinia melanocephala***. Disponível em: <<https://gd.eppo.int/taxon/PUCCML>>.

FALEIRO, F. G. **Marcadores genético-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos.** Planaltina: Embrapa Cerrados, 2007. 102 p.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Faostat, Data, 2024.** Disponível em: <<https://www.fao.org/faostat/en/#data>>.

GLYNN, N. C.; LABORDE, C.; DAVIDSON, R. W.; IREY, M. S.; GLAZ, B.; D'HONT, A.; COMSTOCK, J. C. Utilization of a major brown rust resistance gene in sugarcane breeding. **Molecular Breeding**, v. 31, p. 323-331, 2013.

GUIMARÃES, C. T.; MAGALHÃES, J. V.; LANZA, M. A.; SCHUSTER, I. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento genético. **Informe Agropecuário**, v. 30, n. 253, p. 24-33, 2009.

HAWKINS, M. T. R.; FLORES, M. F. C.; MCGOWEN, M.; HINCKLEY, A. A comparative analysis of extraction protocol performance on degraded mammalian museum specimens. **Frontiers in Ecology and Evolution**, v. 10, p. 1-10, 2022.

HOGARTH, D. M.; RYAN, C. C.; TAYLOR, P. W. J. Quantitative inheritance of rust resistance in sugar cane. **Field Crops Research**, v. 34, n. 2, p. 187-193, 1993.

HOY, J. W.; HOLLIER, C. A. Effect of brown rust on yield of sugarcane in Louisiana. **Plant Disease**, v. 93, n. 11, p. 1171-1174, 2009.

KIMATI, H.; AMORIM, L.; FILHO BERGAMIN, A.; CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. M. **Manual de Fitopatologia.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1995-1997. 706 p.

- KOCK, G. **Eficácia de fungicidas no controle das ferrugens marrom e alaranjada da cana-de-açúcar**. 2020. 51 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Curitiba, 2020.
- KOCH, G.; RUARO, L.; CALEGARIO, R. F.; BESPALHOK FILHO, J. C.; DAROS, E.; OLIVEIRA, R. A.; DUARTE, H. S. S. Control of Orange rust and brown rust of sugarcane with systemic fungicides. **Sugar Tech**, v. 23, p. 606-614, 2021.
- LI, Z.; SU, Y-C.; YU, Q.; CHEN, Y.; GAO, S-W.; ZHANG, Y-G.; QUE, Y-X.; XU, L-P. Molecular insights into brown rust resistance and potential epidemic based on the *Bru1* gene in sugarcane varieties and new elite clones. **Euphytica**, v. 214, n. 189, 2017.
- LIMA, W. T. **Método para classificação da reação de genótipos de cana-de-açúcar às ferrugens marrom e alaranjada**. 2021. 44 p. Monografia (Curso de Engenharia Agrônômica) – Universidade Federal de São Carlos, Araras, 2021.
- MACCHERONI, W.; MATSUOKA, S. Manejo das principais doenças da cana-de-açúcar. *In*: SEGATO, S. V.; PINTO, A. S.; JENDIROBA, E.; NÓBREGA, J. C. M. (Orgs). **Atualização em produção de cana-de-açúcar**. Piracicaba: Prol, 2006. p. 239-256.
- MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **AGROFIT – Sistema de Agrotóxicos Fitossanitários**. Disponível em: <https://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>.
- MARTINEZ, G. G.; SANTOS, A. L. F.; OLIVEIRA, C. Q. P.; MORAES, T. I. Estocagem de DNA a temperaturas variadas: análise da concentração. **Revista Saúde em Foco**, v. 10, n. 5, p. 42-50, 2018.
- MATSUOKA, S.; ARIZONO, H.; MASUDA, Y. Variedades de cana: minimizando riscos na adoção. **Revista STAB**, v. 17, n. 2, p. 18-19, 1999.
- MATSUOKA, S.; GARCIA, A. A. F.; ARIZONO, H. Melhoramento da cana-de-açúcar. *In*: BOREM, A. **Melhoramento de espécies cultivadas**. Viçosa: Editora UFV, 2005. p. 225-274.
- MERCK. **Troubleshooting PCR and RT-PCR amplification**. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt>>.
- MOLBERT, N.; GHANAVI, H. R.; JOHANSSON, T.; MOSTADIUS, M.; HANSSON, M. C. An evolution of DNA extraction methods on historical and roadkill mammalian specimen. **Scientific Reports**, v. 13, n. 13080, 2023.
- MORAIS, L. K.; CURSI, D. E.; SANTOS, J. M.; SAMPAIO, M.; CÂMARA, T. M. M.; ALBUQUERQUE E SILVA, P.; BARBOSA, G. V.; HOFFMANN, H. P.; CHAPOLA, R. G.; FERNANDES JÚNIOR, A. R.; GAZAFFI, R. **Melhoramento genético da cana-de-açúcar**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2015. 38 p. (Embrapa Tabuleiros Costeiros. Documentos, 200).

MOURA, G. L.; GHELLER, A. C. A.; MATSUOKA, S. and GIGLIOTI, E. A. The impact of rust (*P. melanocephala*) on sugarcane production in the state of São Paulo. *In: XXXII Congresso Brasileiro de Fitopatologia*, Curitiba, Brasil. **Anais [...]**. Fitopatologia Brasileira 24 (supl), 1999, p. 279.

NASCIMENTO, E. R.; CUNHA, N. C.; PEREIRA, V. L. A.; MACHADO, L. S.; ABREU, D. L. C. **Manual de técnicas em biologia molecular**. Niterói: Eduff, 2022. p. 61.

NEUBER, A. C. **Presença do gene *Bru1* e comportamento diferencial de genótipos de cana-de-açúcar e acessos exóticos a *Puccinia melanocephala***. 2015. 45 p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2015.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ROESE, A. D.; ANTHONISEN, D. G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M. M.; SCAGLIUSI, S. M. M.; TIMÓTEO, W. H. B.; JARDIM, S. N. **Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio de reação em cadeia da polimerase**. São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2007. 43 p.

OLIVEIRA, G. K.; BARRETO, F. Z.; BALSALOBRE, T. W. A.; CHAPOLA, R. G.; HOFFMANN, H. P.; CARNEIRO, M. S. Molecular evaluation and phenotypic screening of brown and orange rust in *Saccharum* germoplasm. **Plos One**, v. 19, n. 7, 2024.

PATEL, M. K.; KAMAT, M. N.; PADHYE, Y. A. A new record of Puccinia on Sugarcane in Bombay. **Current Science**, v. 19, n. 4, p. 121-122, 1950.

PARCO, A. S.; AVELLANEDA, M. C.; HALE, A. H.; HOY, J. W.; KIMBENG, C. A.; PONTIF, M. J.; GRAVOIS, K. A.; BAISAKH, N. Frequency and distribution of the brown rust resistance gene *Bru1* and implications for the Louisiana sugarcane breeding programme. **Plant Breeding**, v. 3, n. 4, p. 1-6, 2014.
PURDY, L. H.; LIU, L.; DEAN, J. L. Sugarcane rust, a newly important disease. **Plant Disease**, v. 69, n. 3, p. 1292-1296, 1983.

RABOIN, L. M.; OLIVEIRA, K. M.; LECUNFF, L.; TELISMART, H.; ROQUES, D.; BUTTERFIELD, M.; HOARAU, J.-Y.; D'HONT, A. Genetic mapping in sugarcane, a high polyploid, using bi-parental progeny: identification of a gene controlling stalk colour and a new resistance gene. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 112, p. 1382-1391, 2006.

RACEDO, J.; PERERA, M. F.; BERTANI, R.; FUNES, C.; GONZÁLEZ, V.; CUENYA, M. I.; D'HONT, A.; WELIN, B.; CASTAGNARO, A. P. *Bru1* gene and potential alternative sources of resistance to sugarcane brown rust disease. **Euphytica**, v. 191, n. 4, p. 429-436, 2013.

RIDESA – REDE INTERUNIVERSITÁRIA PARA O DESENVOLVIMENTO DO SETOR SUCROENERGÉTICO. **História da RIDESA**. Disponível em: <<https://www.ridesa.com.br/historia>>.

- ROSA, D. D. A fast DNA extraction method for bacteria. **Summa Phytopathologica**, v. 34, n. 3, p. 259-261, 2008.
- RUAN, X-Y.; YAN, F.; SUN, C-J. Occurrence of *Puccinia erianthi* on sugarcane in Yunnan province. **Acta Mycologica Sinica**, v. 2, p. 260-261, 1983.
- SANGUINO, A.; TOLEDO, A. C. D. Considerações sobre a ferrugem da cana-de-açúcar. **Boletim técnico Copersucar**, v. 22, p. 25-31, 1983.
- SATHE, A.V. Nomenclature revision of the common rust fungus affecting sugarcane. **Current Science**, v. 40, n. 2, p. 42-43, 1971.
- SCHRADER, C.; SCHIELKE, A.; ELLERBROEK, L. JOHNE, R. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology**, v. 113, p. 1014-1026, 2012.
- SHAO, W.; KHIN, S. KOPP, W. C. Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. **Biopreservation and Biobanking**, v. 10, n. 1, p. 4-11, 2012.
- SHINE J. M.; COMSTOCK, J. C.; DEAN, J. L. Comparison of five isolates of sugarcane brown rust and differential reaction of six sugarcane clones. **Sugar Cane International**, v. 23, n. 5, p.24-29, 2005.
- SILVA, D. L. G.; BATISTI, D. L. S.; FERREIRA, M. J. G.; MERLINI, F. B.; CAMARGO, R. B.; BARROS, B. C. B. Cana-de-açúcar: aspectos econômicos, sociais, ambientais, subprodutos e sustentabilidade. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, 2021.
- SORDI, R. A.; MATSUOKA, S.; MASUDA, Y.; AGUILLERA, M. M. Sugarcane rust: a new problem in Brazil. **Fitopatologia Brasileira**, v. 13, n. 4, p. 313-316, 1988.
- SOUZA, B. F. Aspectos gerais da ferrugem alaranjada da cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Iniciação Científica**, Itapetinga, v. 5, n. 5, p. 32-47, 2018.
- THERMO FISHER SCIENTIFIC. **PCR troubleshooting guide**. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>>.
- THUROW, L. B.; CASTRO, C. M.; PEREIRA, A. S. Melhoramento de plantas visando à resistência a patógenos. *In*: DALLAGNOL, L. J. **Resistência genética: de plantas a patógenos**. Pelotas: UFPel, 2018. p. 65-102.
- TOKESHI, H.; RAGO, A. Doenças da cana-de-acucar. *In*: KIMATI, H.; AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A.; CAMARGO, L. E. A. (Ed). **Manual de Fitopatologia: Doenças das plantas cultivadas**. São Paulo: Ceres, 2005. p. 185-196.
- TSAI, W. L. E.; SCHEDL, M. E.; MALEY, J. M.; MCCORMACK, J. E. More than skin and bones: comparing extraction methods ad alternative sources of DNA from avian

museum specimens. **Molecular Ecology Resources**, v. 20, n. 5, p. 1220-1227, 2019.

WANG, H-B.; CHEN, P-H.; YANG, Y-Q.; D'HONT, A.; LU, Y-H. Molecular insights into the origin of the brown rust resistance gene *Bru1* among *Saccharum* species. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 130, p. 2431-2443, 2017.

WANG, X-Y.; LI, W-F.; HUANG, Y-K.; LU, X.; LUO, Z-M.; YIN, J.; SHAN, H-L.; ZHANG, R-Y. Evaluation of sugarcane introgression lines for resistance to brown rust disease caused by *Puccinia melanocephala*. **Tropical Plant Pathology**, v. 38, n. 2, p. 97-101, 2013.

ZHAO, D.; GLYNN, N. C.; GLAZ, B.; COMSTOCK, J. C.; SOOD, S. Orange rust effects on leaf photosynthesis and related characters of sugarcane. **Plant Disease**, v. 95, n. 6, p. 640-647, 2011.

ZHANG, R-Y.; SHAN, H-L.; YANG, K.; WANG, X-Y.; CANG, X-Y.; WANG, C-M.; YIN, J.; LUO, Z-M.; LI, W-F.; HUANG, Y-K. Identification of brown rust resistance in the field and detection of the *Bru1* gene in sugarcane varieties. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v. 21, n. 2, 2021.

